

**Vergleich von drei verschiedenen Methoden zur Bestimmung des S100-
Proteins im Serum von Patienten mit malignem Melanom**

**Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades**

doctor medicinae (Dr. med.)

Vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Anika Ziermann
geboren am 22.03.1983 in Rudolstadt

Gutachter:

1. Prof. Dr. med. Johannes Norgauer, Jena
2. PD Dr. med. Udo Markert, Jena
3. Prof. Dr. med. Uwe Wollina, Dresden

Tag der öffentlichen Verteidigung: 06.10.2009

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ADO	Arbeitsgemeinschaft Dermatologische Onkologie
AG	Antigen
AJCC	American Joint Committee on Cancer
AK	Antikörper
ALM	Akral-lentiginöses Melanom
bzw.	beziehungsweise
cDNA	(engl. complementary DNA) komplementäre DNS, die mithilfe der reversen Transkriptase aus mRNA hergestellt wird
Chr.	Chromosom
cm	Zentimeter
CT	Computertomografie
df	Freiheitsgrade
d.h.	das heißt
DNA	(engl. deoxyribonucleic acid) Desoxyribonukleinsäure
ECLIA	Elektro-Chemi-Lumineszenz-Immuno-Assay
EIA	Enzymimmunoassay
ELISA	Enzyme-Linked-Immunosorbent-Assay
et al.	(lat. et alii) und andere
EW	Einwohner
gp100	Glykoprotein 100, zytoplasmatisches AG korrespondierend zu HMB-45
h	Stunde/Stunden
hCG	humanes Choriogonadotropin
HMB-45	human-melanoma-black 45, monoklonaler AK des gp100
HRP	(engl. horseradish-peroxidase) Meerrettich-Peroxidase
Il	Interleukin
INF	Interferon
IU	(engl. international unit) Internationale Einheit
i.v.	intravenös
kDA	Kilodalton
L	Liter
LASA-p	(lipid associated sialic acid p) Lipid-gebundenen Sialsäure p

LDH	Laktatdehydrogenase
LK	Lymphknoten
LMM	Lentigo maligna Melanom
M	Mol
m ²	Quadratmeter
MAGE	Melanom-assoziiertes Antigen
mAK	monoklonaler Antikörper
MART-1	(engl. melanoma antigen recognized by T-cells 1) durch T-Zellen erkanntes Melanom-Antigen 1
mg	Milligramm
MHz	Mega-Hertz
MIA	(engl. melanoma inhibitory activity) Melanome inhibierende Aktivität
mL	Milliliter
mm	Millimeter
Mio.	Millionen
mRNA	(engl. messenger ribonucleic acid) Boten-Ribonukleinsäure
MRT	Magnetresonanztomografie
MTS	Metastasen
µL	Mikroliter
µg	Mikrogramm
n	Anzahl
nm	Nanometer
NSE	Neuronen-spezifische Enolase
p	(engl. probability) Wahrscheinlichkeit
PBS	Phosphat-gepufferte Salzsäure
PCR	Polymerasekettenreaktion
PET	Positronenemissionstomografie
PSA	Prostata-spezifisches Antigen
r	Stichproben-Maßkorrelationskoeffizient
R	Bestimmtheitsmaß
reg.	regionale
RLU	(engl. relative light units) relative Lichtenheiten, Maß für Lichtenergie
ROC	reciever operating characteristic
rs	Stichproben-Rangkorrelationskoeffizient

RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion
s	Sekunde/Sekunden
SLND	(engl. sentinel lymphnode dissection) Wächterlymphknotenentfernung
sICAM	(engl. soluble intercellular adhesion molecule) lösliches interzelluläres Adhäsionsmolekül
s-IL-2-R	löslicher Interleukin-2-Rezeptor
SSM	Superfiziell spreitendes Melanom
sVCAM	(engl. soluble vascular celladhesion molecule) lösliches vaskuläres Zelladhäsionsmolekül
Tab.	Tabelle
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
TNF- α	Tumornekrosefaktor-alpha
u.a.	unter anderem
u./o.	und/oder
UV	ultraviolett
WMW-Test	Wilcoxon-Mann-Whitney-Test (u-Test)
z.B.	zum Beispiel
ZNS	zentrales Nervensystem

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	I
Inhaltsverzeichnis	VI
1. Zusammenfassung	1
2. Einleitung und Grundlagen.....	3
2.1. Das maligne Melanom.....	2
2.1.1. Definition.....	2
2.1.2. Epidemiologie.....	2
2.1.3. Ätiologie und Risikofaktoren	3
2.1.4. Diagnostik	4
2.1.4.1. Untersuchung der Haut.....	4
2.1.4.2. Histopathologische Diagnostik.....	5
2.1.4.3. Ausbreitungsdiagnostik	6
2.1.4.3.1. Wächterlymphknotendiagnostik.....	6
2.1.4.3.2. Positronenemissionstomografie.....	7
2.1.5. AJCC-Klassifikation für das maligne Melanom	8
2.1.6. Prognose	9
2.1.7. Therapieempfehlungen der Arbeitsgemeinschaft Dermatologische Onkologie...9	
2.1.8. Nachsorgeschema	10
2.2. Tumormarker.....	11
2.2.1. Definition.....	11
2.2.2. Bedeutung von Tumormarkern in der klinischen Routine	12
2.3. Tumormarker des malignen Melanoms.....	12
2.3.1. Das S100-Protein.....	13
2.3.1.1. Struktur und genetische Lokalisation	13
2.3.1.2. Biologische Funktion von S100-Proteinen in der Epidermis	14
2.3.1.3. S100 β als Tumormarker des malignen Melanoms	15
2.3.2. MIA	16
2.3.3. Laktatdehydrogenase.....	17
2.3.4. sICAM-1	17
2.3.5. Tyrosinase.....	18
2.3.6. Melan A/Mart 1	19

3. Zielstellung	20
4. Methoden	21
4.1. Patienten	21
4.2. Material	23
4.3. Untersuchungsverfahren zur Bestimmung des S100 β	23
4.3.1. Enzymimmunoassay (EIA) CanAg S100®.....	23
4.3.2. Elektro-Chemi-Lumineszenz-Immuno-Assay (ECLIA) Elecsys® 1010	26
4.3.3. Enzyme-Linked-Immunosorbent-Assay (ELISA) Sangtec®100.....	28
4.4. Statistik	30
5. Ergebnisse	33
5.1. Korrelationsanalysen	33
5.2. Untersuchung der Validität der Testverfahren mithilfe des WMW-Tests	35
5.2.1. Vergleich der S100-Werte von Patienten mit und ohne Metastasierung	35
5.2.2. Untersuchung auf statistisch signifikante Unterschiede der S100-Werte in Abhängigkeit vom Tumorstadium.....	36
5.2.3. Vergleich der S100-Werte in Abhängigkeit von Tumorstadium und Metastasierung.....	39
5.3. Statistische Untersuchungen zum Vergleich der Methoden von Dako, DiaSorin und Roche.....	42
5.3.1. Vergleich der Testergebnisse mithilfe des Cochran-Tests	42
5.3.2. Vergleich der Testergebnisse mithilfe des McNemar-Tests	43
5.3.3. Berechnung von Sensitivität, Spezifität sowie Vorhersagewerten.....	46
5.3.4. Bestimmung der ROC-Kurven	48
6. Diskussion	50
7. Schlussfolgerung	61
8. Literatur- und Quellenverzeichnis.....	63
9. Anhang	75
9.1. Danksagung	75
9.2. Ehrenwörtliche Erklärung	76
9.3. Lebenslauf	77

1. Zusammenfassung

Das S100-Protein ist der etablierteste Tumormarker im Management des malignen Melanoms, insbesondere bei Verlaufskontrollen im Rahmen der Nachsorge oder der Beurteilung des Ansprechens von therapeutischen Maßnahmen. In einer Vielzahl von Studien wurde der klinische Nutzen des S100-Proteins untersucht. Obwohl zum Screening ungeeignet, konnte insbesondere in fortgeschrittenen Stadien die prognostische Wertigkeit des Markers nachgewiesen werden. In der vorliegenden Studie wurden drei verschiedene Verfahren zur Bestimmung des Tumormarkers miteinander verglichen: der Sangtec®100 ELISA von DiaSorin, der CanAg S100 EIA von DakoCytomation und der Elecsys®1010 ECLIA von Roche. Neben der Korrelationsanalyse der gemessenen Konzentrationen, erfolgte die Beurteilung der Validität der Messverfahren in Bezug auf das Tumorstadium und einer vorhandenen Metastasierung. Weiterhin erfolgten die Bestimmung der diagnostischen Sensitivität und Spezifität sowie die Analyse der Testentscheidungen auf statistische Unterschiede in Anbetracht der aktuellen klinischen Befunde. Unabhängig vom Cut-off wurde außerdem die Testgüte mithilfe der Berechnung von ROC-Kurven verglichen.

Die Auswertung der Daten zeigte, dass die ermittelten S100-Konzentrationen aller drei Verfahren gut miteinander korrelierten. Signifikante höhere S100-Werte konnten beim Vergleich von Patienten mit Metastasen gegenüber Patienten ohne aktuell nachweisbare Metastasierung beobachtet werden. Weiterhin wurde gezeigt, dass Patienten im Stadium I signifikant niedrigere Serumkonzentrationen des Markers aufwiesen, als Patienten im Stadium IV. In Abhängigkeit vom Cut-off wurden mit dem Sangtec®100 ELISA signifikant häufiger richtig positive sowie falsch positive Testergebnisse erzielt. Die Sensitivität des Verfahrens war mit 52% (alle Stadien) bzw. 68% (Stadium IV) am größten, die Spezifität am geringsten (82% bzw. 80%). Bei der Analyse der Verfahren unabhängig des Cut-offs mithilfe von ROC-Kurven war kein Verfahren den anderen deutlich überlegen, mit weitgehender Überlappung der Konfidenzintervalle.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass alle drei Verfahren in der klinischen Praxis als gleichwertig zu betrachten sind. Der Cut-off sollte entsprechend der eigenen Laborbedingungen und Patientenkontexts sowie in Anbetracht von Erfahrungswerten mit dem jeweiligen Assay in der klinischen Routine festgelegt werden. Aufgrund von nicht vergleichbaren absoluten Konzentrationen sind bei einem Wechsel der Methodik Parallelmessungen zu empfehlen. Ringversuche zur Bestimmung des S100-Proteins könnten die Aussagekraft und Vergleichbarkeit verbessern. Der vollautomatische ECLIA besitzt Vorteile aufgrund der einfachen Anwendung und kürzesten Analysezeit.

2. Einleitung und Grundlagen

2.1. Das maligne Melanom

2.1.1. Definition

Das maligne Melanom ist der bösartigste Tumor der Haut und geht meist von den epidermalen Melanozyten aus. Seltener kann der Tumor auch durch die Entartung pigmentierter Zellen der Konjunktiva, der Uvea, den Hirnhäuten und Schleimhäuten unterschiedlicher Lokalisation auftreten. Meist zeichnet sich das maligne Melanom durch eine starke Pigmentierung aus, mit Ausnahme des selteneren amelanotischen Subtyps. In Abhängigkeit von der Tumordicke besteht die Tendenz zur frühzeitigen Metastasierung und damit ungünstigen Prognose.

2.1.2. Epidemiologie

In einer aktuellen Studie von Lasithiotakis und Mitarbeitern (2006) wurde die Entwicklung der Inzidenz und Mortalität des malignen Melanoms in Baden-Württemberg von 1976 bis 2003 anhand von Daten des Zentralen Tumorregisters für das maligne Melanom untersucht. Die Ergebnisse zeigten, dass die Anzahl der neu diagnostizierten Fälle bei Männern von 3,4 Fällen/100000 Einwohner pro Jahr in 1976 auf 10,3 Fälle pro 100000 EW pro Jahr in 2003 angestiegen ist. Bei den Frauen zeigte sich ein ähnliches Bild. Hier wurde ein Anstieg von 4,3 Fällen/100000 EW pro Jahr auf 13,3 Fälle pro 100000 EW pro Jahr festgestellt, was etwa einer Verdreifachung der Inzidenz entspricht. In Deutschland erkrankten nach aktuellen Berichten der Deutschen Krebshilfe (www.krebshilfe.de) insgesamt 22000 Menschen pro Jahr am malignen Melanom, 2300 versterben daran.

Diese Inzidenzzunahme bezieht sich aber vor allem auf Tumore mit einer Tumordicke $< 2\text{mm}$, während die Inzidenz für dickere Malignome in diesem Zeitraum stabil geblieben ist. Daraus ergibt sich eine Reduktion der Mortalitätsrate von 1,5 bzw. 2,6 Fällen/100000EW pro Jahr auf 0,8 Fälle/100000EW pro Jahr für Männer und Frauen, aufgrund der wesentlich besseren Prognose für dünnere Läsionen. Als Ursache für diese Entwicklung wird die frühere Diagnose der Erkrankung infolge eines gesteigerten Gesundheitsbewusstseins in der Bevölkerung und der verbesserten Aufklärung über die Erkennung verdächtiger Hautveränderungen diskutiert. Bei 90% der Männer und 93% der Frauen mit malignem Melanom ist zum Zeitpunkt der Erst-diagnose nur der Primärtumor nachweisbar. In 8% bzw. 6% der Fälle zeigen sich loko-

regionale Metastasen. Fernmetastasen sind in 1,6% bei Männern bzw. 1,1% bei Frauen bei Erstdiagnose diagnostizierbar (Garbe et Blum 2001).

In einer weiteren Studie von Lasithiotakis et al. (2007) konnte darüber hinaus beobachtet werden, dass nicht allein die frühzeitige Diagnose prognostisch günstigerer Tumorstadien Einfluss auf die Verbesserung der Überlebensdauer von Melanompatienten hat. Unabhängig von Tumordicke, Ulzeration, Alter, Geschlecht und Tumorlokalisation zeigten sich signifikant bessere Überlebensraten der Patienten, bei denen im Zeitraum von 1990-2001 ein Melanom diagnostiziert werden konnte im Vergleich zur Diagnose in 1976-1989. Daher sind Faktoren, die sich im Management des malignen Melanoms in diesen Zeiträumen veränderten, ebenfalls als mögliche Gründe für die Verbesserung der Überlebenszeit zu werten. Dazu gehören die Durchführung der Wächterlymphknotenbiopsie, adjuvante Behandlungsstrategien, verbesserte Nachsorgekonzepte und chirurgische Intervention bei Fernmetastasen.

2.1.3. Ätiologie und Risikofaktoren

Die Ätiologie der malignen Melanome wird bis heute noch nicht vollständig verstanden. UV-Licht, insbesondere UVB, gilt als der bedeutendste exogene Faktor für die Entwicklung von Hautkrebs. Dies zeigt sich u.a. in der höchsten Inzidenz von 50-60 Fällen pro 100000 EW und Jahr in Australien. Bei Einwanderern, die vor dem 10. Lebensjahr nach Australien gezogen sind, wurden vergleichbare Inzidenzen wie bei hellhäutigen in Australien geborenen Personen beobachtet. Erfolgte die Einwanderung erst im höheren Lebensalter, dann verringerte sich das Melanomrisiko deutlich. Insbesondere intermittierende UV-Belastungen und daraus resultierende Sonnenbrände vor dem 20. Lebensjahr stellen den bedeutendsten Risikofaktor für die Entwicklung von malignen Melanomen durch UVB dar (Garbe 1992, Kennedy 2003).

In 5-10% der Fälle kommen Melanome familiär gehäuft vor. Verschiedene polygene Erbfaktoren werden als Ursache diskutiert. Tomescu et al. (2001) sowie Povey et al. (2007) konnten einen signifikanten Zusammenhang zwischen dem Polymorphismus von Genen, die für die Reparatur von UV-Licht induzierten DNA-Schäden zuständig sind, und dem Auftreten von malignen Melanomen feststellen. Ebenso sind Mutationen im p53 Tumorsuppressorgen sowie anderen den Zellzyklus-kontrollierenden Genen, untersucht worden (Soto et. al 2005). Auf dem derzeitigen Stand der Forschung sind die Gene CDKN2A (Chr. 9p21) und CDK4 (Chr. 12q13) mit dem höchsten Risiko zur Entwicklung eines Melanoms assoziiert (Fargnoli et al. 2006).

30% der malignen Melanome entwickeln sich auf vorbestehenden melanozytären Naevi. Personen mit hoher Anzahl von melanozytäre Naevi (>50 erworbenen Naevi bzw. >3 dysplastische Naevi) sowie Patienten mit zusätzlichen aktinischen Lentigines haben ein erhöhtes Risiko ein Melanom zu entwickeln (Garbe 1995, Garbe et al. 1994, Holly et al. 1987). Als weitere Riskofaktoren sind große angeborene Naevi und ein keltischer Hauttyp (Typ I/II) bekannt. Personen mit roten Haaren besitzen ein 3,5fach erhöhtes Risiko gegenüber Schwarzhaarigen. Die Augenfarbe ist ein eher schwacher Risikofaktor. Der Einfluss von immunologischen Faktoren zeigt sich in aggressiven Verläufen bei Immunsupprimierten und den Berichten von Spontanremissionen.

2.1.4. Diagnostik

2.1.4.1. Untersuchung der Haut

Der Verdacht auf ein malignes Melanom liegt vor, wenn eine pigmentierte Hautläsion neu aufgetreten ist, wächst oder sich farblich verändert. Klinisch werden Hautveränderungen nach der ABCD-Regel beurteilt:

- A- asymmetrischer Aufbau,
- B- Begrenzung unregelmäßig,
- C- Colorit inhomogen und
- D- Durchmesser >5mm.

Zusätzlich wird nach aktuellen Studien (Abbasi et al. 2004) empfohlen, diese Regel zu erweitern um

- E- Erhabenheit der Läsion oder Enlargement (seitliche Erweiterung).

Zur Sicherung der Verdachtsdiagnose sollte die Dermatoskopie herangezogen werden. Mit dem Dermatoskop wird eine 10-40fache Vergrößerung erreicht. Durch einen Immersionsfilm wird die Reflexion des einfallenden Lichts auf die Hautoberfläche vermindert. Damit ist eine Sicht in tiefere Schichten bis zur papillären Dermis möglich. Bei der Beurteilung melanozytärer Veränderungen im Verlauf ist die computergestützte Dermatoskopie hilfreich. Mithilfe der hochauflösenden Sonografie der Haut kann präoperativ die Tumordicke bestimmt werden. Kraehn et al. (1998) zeigten, dass die mit einer Frequenz von 20MHz bestimmte Tumordicke sehr gut mit den histologisch ermittelten Werten korreliert.

2.1.4.2. Histopathologische Diagnostik

Die Sicherung der Diagnose eines Melanoms kann nur durch die chirurgische Exzision des Tumors und die histologische Beurteilung erfolgen. Der histologische Befund sollte den Melanomtyp und die Tumordicke nach Breslow beinhalten. Sie wird definiert als größter vertikaler Tumordurchmesser vom obersten Niveau des Stratum granulosum bis zur maximalen Tumorausdehnung (Breslow 1970). Darüber hinaus ist die Eindringtiefe nach Clark (Clark et al. 1969), siehe Tab. 1, zu bestimmen. Die Messung der Tumordicke nach Breslow ist jedoch zuverlässiger, da sie unabhängiger ist von persönlichen und regionalen Schwankungen der Hautdicke. Weiterhin sollten Aussagen über Regression, Ulzeration und den Einbruch des Tumors in Lymph- und Blutgefäße sowie Perineuralscheiden getroffen werden. Außerdem werden die mögliche Absiedelung von Mikrometastasen und die Tumorfreiheit der Schnittträger untersucht.

Tab. 1: Einteilung der Tumordinvasion nach Clark und Mitarbeitern (1969)

Clark-Level	Tumoreindringtiefe
Level I	Tumorzellen ausschließlich in der Epidermis (MM in situ)
Level II	Tumorzellen durchbrechen Basalmembran bis in das Stratum papillare
Level III	Tumorzellen im oberen Corium (gesamtes Stratum papillare) bis zur Grenzzone des Stratum reticulare
Level IV	Tumorzellen im mittleren und unteren Corium (gesamtes Stratum reticulare)
Level V	Tumorzellen im subkutanen Fettgewebe

Bei histologisch unklaren Befunden, insbesondere amelanotischen Tumoren oder dem Verdacht auf kutane Metastasen, erfolgt die immunphänotypische Charakterisierung. Clarkson und Mitarbeiter (2001) untersuchten verschiedene Antikörper zur Differenzierung melanozytärer Läsionen. Das S100-Protein erwies sich als sensitivster Marker bei der Diagnostik, jedoch mit geringerer Spezifität. Die histochemische Färbung mit HMB-45 zeichnete sich durch die geringste Sensitivität, jedoch höhere Spezifität aus. Weiterhin wurden Antikörper gegen Melan A und Tyrosinase untersucht, wobei die Werte zwischen denen des S100 Proteins und HMB-45 lagen. Aufgrund der beobachteten Ergebnisse wird zur immunhistochemischen Färbung zum Nachweis von malignen Melanomen die Verwendung von S100-Antikörpern in Kombination mit HMB-45 und Melan A-Antikörpern empfohlen. Auch Tyrosinase-Antikörper können zur Detektion von Melanomen genutzt werden, jedoch ergaben sich keine zusätzlichen Informationen im Vergleich zur Verwendung der oben genannten immunhistochemischen Marker.

2.1.4.3. Ausbreitungsdiagnostik

Ziel der Ausbreitungsdiagnostik ist die Festlegung des Stadiums der Erkrankung zum Zeitpunkt der Erstdiagnose. Durch die Definierung des Tumorstadiums sind Aussagen über die Prognose und die Festlegung des therapeutischen Prozedere möglich. Weiterhin können vorbestehende benigne Organveränderungen dokumentiert und zur späteren Abgrenzung von der Entwicklung maligner Prozesse genutzt werden.

In Anlehnung an die Leitlinien für die Therapie des malignen Melanoms sollte eine zusätzliche Ausbreitungsdiagnostik bei Tumoren mit einer Dicke von >1mm erfolgen. Obligatorisch ist eine gründliche Inspektion des gesamten Integuments sowie die Inspektion und Palpation der regionären Lymphabflussgebiete und Lymphknotenstationen. Die wichtigste apparative Untersuchung ist die Lymphknotenultraschalluntersuchung, die im Vergleich zur Palpation signifikant früher eine Metastasierung im Bereich der Lymphknoten anzeigt. Mithilfe der SLND werden Aussagen über die lymphogene Metastasierung in die ersten drainierenden Lymphknoten möglich. Zur weiteren bildgebenden Diagnostik gehört eine Röntgen-Thorax Aufnahme in zwei Ebenen sowie die Sonografie des Abdomens, einschließlich des Beckens und Retroperitoneums. Bei Risikopatienten oder suspekten Vorbefunden können zusätzlich aufwendigere Maßnahmen wie die Magnetresonanztomografie des Schädels, die Computertomografie (CT-Thorax, -Abdomen und/oder -Becken), eine Skelettszintigrafie, eine Positronenemissionstomografie sowie die Bestimmung von Tumormarkern notwendig sein.

2.1.4.3.1. Wächterlymphknotenbiopsie

Die Wächterlymphknotenbiopsie (SLND) ist keine therapeutische Maßnahme, sondern dient dem Staging von malignen Tumoren. Die SLND stellt eine risikoarme, minimal invasive, diagnostische Methode dar, um eine frühzeitige lymphogene Tumorausbreitung bei klinisch unauffälligem Lymphknotenstatus zu entdecken. Das Verfahren wurde entwickelt, um den ersten drainierenden Lymphknoten im jeweiligen regionalen Lymphabflussgebiet darzustellen und immunhistologisch auf Vorhandensein von Mikrometastasen zu untersuchen. Es konnte nachgewiesen werden, dass die rezidivfreie Überlebenszeit eindeutig mit dem Status des Wächterlymphknotens korreliert (Gershenwald et al. 1999, Berk et al. 2005, Morton et al. 2006). Eine Ausnahme bilden Melanome im Kopf-Hals-Bereich aufgrund der Nähe des Primärtumors zum Lymphgefäßsystem und sich überschneidender Lymphabstrombahnen. Die Arbeitsgemeinschaft Dermatologische Onkologie empfiehlt die SLND ab einer Tumordicke

über 1,0mm. Beim Vorhandensein von zusätzlichen, die Prognose verschlechternder Faktoren (Regression, Ulzeration, Clark-Level VI-V), kann sie auch bei geringerer Dicke erwogen werden.

Die Biopsie des Sentinel-Lymphknotens hat nach ihrer Einführung die elektive Lymphknotendisektion aus der klinischen Praxis verdrängt, welche mit höherem intra- und postoperativen Komplikationen (u.a. Infektion, Lymphödeme) bei nicht signifikanter Verbesserung der Überlebensdauer verbunden ist. Patienten mit vorhandener Metastasierung profitierten jedoch von diesem Verfahren (Cascinelli et al. 1998). Mithilfe der SLND ist es möglich, dieses Patientenkollektiv zu selektieren und gegebenenfalls einer vollständigen Lymphknotenausräumung zu unterziehen. Gleichzeitig ermöglicht die SLND homogenere Patientenkollektive im Rahmen von Studien und eine bessere Auswahl von Patienten zur adjuvanten Therapie.

2.1.4.3.2. Positronenemissionstomografie (PET)

Mithilfe der PET ist es möglich den gesamten Körper nach Metastasen zu scannen. Da sich Tumorzellen in der Regel durch einen erhöhten Stoffwechsel auszeichnen, kommt es zu einer vermehrten Aufnahme des Radionuklids ^{18}F -FDG.

In frühen Tumorstadien (I/II) ist die PET der SLND zur Diagnostik einer Metastasierung in den Wächterlymphknoten unterlegen. Die Sensitivität der Methodik ist abhängig vom Volumen des Tumors. Das Durchschnittliche Tumolvolumen eines SLN beträgt $4,3\text{mm}^3$. Um mit der PET eine Sensitivität von 90% zu erreichen, ist jedoch eine Größe von 78mm^3 notwendig (Wagner 2001, Wagner 1999). Damit eignet sich die PET nicht für die Diagnostik von Mikrometastasen, welche in frühen Stadien häufig beobachtet werden.

Bei Patienten im fortgeschrittenen Stadium (III b/IV) ist die PET eine sehr sensitive Methode zur Diagnostik einer systemischen Tumorausbreitung. In einer Meta-Analyse aktueller Studien über die Anwendung und Aussagekraft der PET bei fortgeschrittenen malignen Melanomen, zeigte sich eine höhere Sensitivität und Spezifität im Gegensatz zu konventionellen Untersuchungsverfahren wie die CT (Belhocine et al 2006). Ein neues Verfahren ist die kombinierte PET/CT-Technik. Neben den anatomischen, können gleichzeitig die metabolischen Merkmale der Läsion begutachtet werden. In den bisherigen Studien zeigte sich dieses Verfahren der konventionellen PET oder CT überlegen (Reinhardt et al. 2006, Schöder et al. 2004).

2.1.5. AJCC-Klassifikation für das maligne Melanom

Das klinische Staging des malignen Melanoms erfolgt nach der vom American Joint Committee on Cancer 2002 erarbeiteten Klassifikation (Tab. 2-5). Als Grundlage dient die Einteilung in das TNM-System unter Beachtung prognostischer Faktoren, wie Ulzeration, Clark-Level und Serum LDH-Spiegel (Balch et al. 2001).

Tab. 2: T- Klassifikation des Primärtumors

T Klassifikation	Tumordicke	Weitere prognostische Parameter
Tis		Melanoma in situ, keine Tumorerinvasion
Tx	Keine Angabe	Stadium nicht bestimmbar*
T1	≤1,0mm	a) ohne Ulzeration und Level II/III b) mit Ulzeration oder Level IV/V
T2	1,01 – 2,0mm	a) ohne Ulzeration b) mit Ulzeration
T3	2,01 – 4,0mm	a) ohne Ulzeration b) mit Ulzeration
T4	>4,0mm	a) ohne Ulzeration b) mit Ulzeration

* Fehlen der Bestimmung der Tumordicke und/oder Ulzeration oder unbekannter Primärtumor

Tab. 3: N- Klassifikation der regionären Lymphknoten

N Klassifikation	Anzahl metastasierter Lymphknoten	Masse der Lymphknoten Metastasen
N1	1 Knoten	a) Mikrometastasierung * b) Makrometastasierung**
N2	2-3 Knoten	a) Mikrometastasierung * b) Makrometastasierung** c) In-transit- Metastase(n)/ Satelliten-Metastase(n) ohne metastasierte Knoten
N3	4 oder mehr Knoten oder In-transit-Metastase(n)/ Satellitenmetastasen mit metastasierten Knoten	

* nach elektiver oder Sentinel-Lymphknoten-Biopsie

** klinisch festgestellte Lymphknoten-Metastasen durch therapeutische Lymphadenektomie bestätigt
oder Lymphknoten-Metastasen mit großer extrakapsulärer Ausdehnung

Tab. 4: M-Klassifikation der Fernmetastasen

M Klassifikation	Art der Fernmetastasen	Serum Laktatdehydrogenase
M1a	Haut, subkutan oder Lymphknoten	normal
M1b	Lunge	normal
M1c	alle anderen Organmetastasen jede Art von Fernmetastase	normal erhöht

Tab. 5: Stadieneinteilung des malignen Melanoms nach den Vorgaben des AJCC 2002

Stadium	Klinisches Staging		
	T	N	M
0	Tis	N0	M0
IA	T1a	N0	M0
IB	T1b	N0	M0
	T2a	N0	M0
IIA	T2b	N0	M0
	T3a	N0	M0
IIB	T3b	N0	M0
	T4a	N0	M0
IIC	T4b	N0	M0
III	jedes T	N1 – N3	M0
IV	jedes T	jedes N	jedes M1

2.1.6. Prognose

In multivariaten Studien (Garbe et al. 1995, Balch et al. 2001) konnte gezeigt werden, dass die Tumordicke nach Breslow, neben der Absiedelung von Metastasen, den prognostischen Faktor mit der größten Signifikanz darstellt. Zusätzlich die Prognose verschlechternde Faktoren sind Ulzerationen, das Invasionslevel nach Clark (insbesondere die Unterscheidung zwischen Stadium II/III und IV/V), männliches Geschlecht (gilt vor allem für Tumore $\leq 2\text{mm}$), Lokalisation am oberen Stamm, Oberarm, Hals und behaartem Kopf sowie histologisch nodulärer Subtyp. Patienten mit Tumordicken $\leq 1\text{mm}$ haben eine 10-Jahres-Überlebensrate von 97%. Mit dem Nachweis einer lokoregionären Metastasierung sinkt die 10-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit auf 30-50%, bei klinisch nachgewiesenen regionären Lymphknotenmetastasen auf 20-40%. Ist eine Fernmetastasierung eingetreten, ist die Prognose infaust. Die mediane Überlebenszeit beträgt unbehandelt 6-9 Monate. Patienten mit Haut-, Lymphknoten- und Lungenmetastasen („limited disease“) haben eine bessere Prognose als Patienten mit Leber-, Knochen- oder Hirnmetastasen („extended disease“).

2.1.7. Therapieempfehlungen der Arbeitsgemeinschaft Dermatologische Onkologie (Garbe et al. 2005)

Die primäre Therapie des malignen Melanoms besteht in der chirurgischen Exzision der Läsion, die je nach Tumordicke durch eine entsprechende Erweiterung des Sicherheitsabstandes und einer SLND ergänzt werden kann. Weitere chirurgische Interventionsmöglichkeiten bestehen bei Rezidiven, lokoregionärer Metastasierung sowie bei regional

begrenzten Lymphknotenmetastasen. Im Stadium IV, bei R0-operablen Metastasen in möglichst nur einem Organ, ist die Exstirpation der Metastase die Therapie der ersten Wahl. Die Strahlentherapie bei Primärtumoren ist nur in Einzelfällen indiziert, wenn operative Eingriffe nicht möglich oder nicht sinnvoll sind. Die stereotaktische Bestrahlung von einzelnen Hirnmetastasen stellt eine gleichwertige Alternative zur Operation dar. Palliativ findet die Strahlentherapie u. a. Anwendung bei Hirn- und Knochenmetastasen, sowie zur Therapie inoperabler Lymphknotenmetastasen.

Eine weitere Therapieoption stellt die Chemotherapie dar, die jedoch überwiegend unter palliativen Gesichtspunkten durchgeführt wird und insgesamt geringe Ansprechraten aufweist. Durch die Kombination verschiedener Chemotherapeutika bzw. die Kombination der zytostatischen Therapie mit Zytokinen konnte ein Zuwachs der Ansprechraten registriert werden (Atzpodien et al. 2002). Das Gesamtüberleben verlängerte sich jedoch nicht. Außerdem führen die Kombinationstherapien zu einer Verschlechterung der Lebensqualität, ein Aspekt der bei der Auswahl des Therapieschemas unbedingt berücksichtigt werden sollte. Ihr Einsatz kann jedoch in Einzelfällen von palliativem Nutzen sein und eine effiziente Therapie von Tumorsymptomen ermöglichen.

Als adjuvante Therapiemöglichkeit bei Patienten mit Risikomelanomen konnte bisher nur für Interferon α eine Wirksamkeit mit signifikanter Verlängerung des rezidivfreien Intervalls nachgewiesen werden. Von der ADO wird die Behandlung von Hochrisikopatienten im Stadium I/II mit niedrigdosierten Interferon α über 18-24 Monate (3×3 Mio. IU pro Woche) empfohlen. Für Patienten im Stadium III kann initial eine Therapie mit Hochdosisinterferon für vier Wochen (20 Mio IU/m^2 i.v.; Tag 1-5 jeder Woche) und anschließend für weitere 11 Monate mit $3 \times 10 \text{ Mio IU/m}^2$ pro Woche erwogen werden. Die Hochdosistherapie ist jedoch aufgrund der vorliegenden Daten umstritten. Für die aktuellen Leitlinien in der Therapie des malignen Melanoms sei auf die Internetseite der Arbeitsgemeinschaft Dermatologische Onkologie verwiesen (<http://www.ado-homepage.de/index.php?ID=71>).

2.1.8. Nachsorgeschema

Die Nachsorgeintervalle und deren Umfang richten sich nach dem jeweiligen Tumorstadium des Patienten (Tab. 6). In den ersten 5 Jahren werden die Kontrollen intensiver durchgeführt, da 90% der Metastasen in diesem Zeitraum auftreten. Grundsätzlich wird eine Nachsorge von 10 Jahren empfohlen. Die jährliche Kontrolle des Integuments sollte sogar lebenslang durchgeführt werden. Ziel der regelmäßigen Untersuchung ist die frühzeitige Erkennung von

Zweitmelanomen, Rezidiven oder Metastasen. Weiterhin werden durch die inspektorische Untersuchung des gesamten Integuments Vorläuferläsionen, die sich zu Zweitmelanomen entwickeln können, erfasst. Darüber hinaus wird eine adjuvante Therapie monitoriert und auf mögliche unerwünschte Nebenwirkungen reagiert. Gleichzeitig sind psychologische und soziale Betreuungsangebote sowie Rehabilitationsmaßnahmen Bestandteil der Nachsorge.

Tab. 6: Empfehlung für die Nachsorge kutaner maligner Melanome (Intervalle in Monaten), (Garbe et al. 2005)

Stadium , Tumor- dicke	Körperliche Untersuchung 1.-5. Jahr	Körperliche Untersuchung 6.-10. Jahr	Lymphknoten- Sonografie 1.-5. Jahr	S100- Protein 1.-5. Jahr	Bildgebende Diagnostik* 1.-5. Jahr
I, ≤1mm	6	12	keine	keine	keine
I, IIa, IIb, >1mm	3	6-12	6	3-6	keine, bei adjuvanter Therapie 6-12
IIc, III	3	6	3-6	3-6	6
IV	individuell				

* Abdomen-Sonografie und Röntgen-Thorax oder CT bzw. MRT oder PET

2.2. Tumormarker

2.2.1. Definition

Als Tumormarker bezeichnet man alle zellulären Veränderungen sowie im Serum nachweisbare Substanzen, deren vermehrtes Auftreten direkt oder indirekt auf eine Tumorerkrankung zurückzuführen ist. Man unterscheidet zelluläre und humorale Marker. Unter zellulären Tumormarkern versteht man direkt auf der Zelloberfläche, im Zytoplasma oder dem Genom der Tumorzelle nachweisbare Strukturen. Dazu gehören Tumorantigene bzw. Rezeptoren, die auf der Zellmembran exprimiert werden, genetische Veränderungen in Form von Mutationen und Chromosomenaberrationen (z. B. Philadelphia-Chromosom) oder die Expression von Antigenen, die physiologisch in der Fetal- und Embryonalperiode nachgewiesen werden können, nicht jedoch im Erwachsenenalter (z. B. α -Fetoprotein).

Unter humoralen Tumormarkern versteht man Substanzen, die gegenüber physiologischen Bedingungen vermehrt in Serum, Urin und anderen Körperflüssigkeiten nachgewiesen werden können (z. B. Hormone, Proteine, Enzyme). Diese Substanzen werden entweder vom Tumorgewebe selbst synthetisiert und sezerniert bzw. beim Zerfall von Tumorgewebe freigesetzt oder die Bildung erfolgt als Reaktion des Organismus auf den Tumor durch nicht-maligne Zellen.

2.2.2. Bedeutung von Tumormarkern in der klinischen Routine

Alle in der klinischen Praxis verwendeten Tumormarker sind bislang nicht eindeutig tumorspezifisch. Jeder eingesetzte Marker kann auch bei gesunden bzw. nicht tumorkranken Probanden nachgewiesen werden. Werte außerhalb der Referenzbereiche, welche meist die 95. oder 97,5. Perzentile untersuchter gesunder Kontrollpersonen repräsentieren, können einen Tumor weder ausschließen noch sicher bestätigen. Insbesondere bei kleinen, lokal begrenzten, nicht metastasierten Tumoren ist die Sensitivität und Spezifität gering. Damit ist die Bestimmung von Tumormarkern zum Screening von unselektiven, asymptomatischen Patientenkollektiven ungeeignet. Lediglich bei der Bestimmung des PSA bei Männern über 50 Jahren zur Früherkennung von Prostatakarzinomen, wird ein Tumormarker als Screening-Verfahren eingesetzt.

Tumormarkern kommt weiterhin bei der Untersuchung von Patienten mit erhöhtem familiären Risiko bzw. Patienten mit Grunderkrankungen, die mit erhöhtem Risiko für die Entwicklung von Malignomen einhergehen, Bedeutung zu. Beispiele dafür sind die Bestimmung von α -Fetoprotein bei Patienten mit Leberzirrhose, α -Fetoprotein und β -hCG bei Verdacht auf Keimzelltumoren sowie Calcitonin bei Verdacht auf medulläre Schilddrüsenkarzinome.

Gleichzeitig kommen Tumormarker bei der Primärdiagnostik im Bereich immunhistologischer Untersuchungen zum Einsatz. Für die Nutzung eines Markers zur Bestimmung der Tumorlokalisation kann bisher lediglich PSA und Thyreoglobulin verwendet werden, die als organspezifisch betrachtet werden. Bei umfangreicher Metastasierung können jedoch auch andere Tumormarker, wie das S100-Protein, zur Orientierung dienen.

Die größte Bedeutung kommt Tumormarkern jedoch derzeit bei der Überwachung der Wirksamkeit von Therapien und der Nachsorge von Tumorpatienten zu. Die Bestimmung des Markers im Blut im Rahmen von Nachsorgeuntersuchungen stellt eine für den Patienten minimal invasive Überwachungsmethode dar, um Rezidive bzw. Metastasen durch ansteigende Werte zu erkennen (Guder et Nolte 2005).

2.3. Tumormarker des malignen Melanoms

In Tab. 7 ist eine Übersicht der im Zusammenhang mit dem malignen Melanom untersuchten Tumormarker dargestellt. Nachfolgend werden die bedeutendsten Marker vorgestellt.

Tab. 7: Zusammenfassung der untersuchten Tumormarker des malignen Melanoms (modifiziert nach Hein et al. 2006)

Zytokine, Zytokinrezeptoren und Zelladhäsionsmoleküle	Il-6, Il-8, Il-10, s-Il-R, sICAM, sVCAM
Substanzen des Melaninstoffwechsels	5-S-Cysteinyl-dopa, 6-Hydroxy-5-Methoxyindol-2-Carboxylsäure, Tyrosinase, L-Dopa/Tyrosin-Quotient
Entzündungsparameter, Enzyme	LDH, C-reaktives Protein, Serummatrixmetalloproteinasen
Melanom-assoziierte Antigene	LASA-P, MAGE 1, MAGE 3, gp100, NSE, MIA, S100 β , Melan A

2.3.1. Das S100-Protein

2.3.1.1. Struktur und genetische Lokalisation

Das S100-Protein wurde erstmals von Moore und Mitarbeitern (1965) aus Gliazellen isoliert. Seinen Namen erhielt das Protein aufgrund seiner Löslichkeit in 100% gesättigter Ammoniumsulfatlösung bei neutralem pH-Wert. Es handelt sich um eine Familie saurer, Kalzium-Ionen bindender Proteine der EF-Hand-Gruppe mit einem Molekulargewicht von 9-12kDa. Das EF-Hand-Motiv wurde von Kretzinger und Nockolds 1972 erstmals identifiziert. Es beschreibt eine typische Proteinstruktur, in der die Bindungsstelle für zweiwertige Kalzium-Ionen aus einer Schleife von Aminosäuren geformt wird, dessen räumliche Anordnung einer Hand ähnelt. Zusätzlich wird die Bindungsstelle von zwei α -Helices umgeben, als E und F bezeichnet (helix-loop-helix). Proteine der S100-Familie besitzen zwei Bindungsstellen für Ca^{2+} und demzufolge 4 Helices, die über ein Verbindungsstück (hinge region) konnektiert sind. Die einzelnen S100-Proteine stimmen zu 25-65% in ihrer Aminosäuresequenz überein, wobei die variabelsten Regionen das Verbindungsstück und das C-terminale Ende darstellen (Santamaria-Kisiel 2006). Mit bislang mindestens 25 Mitgliedern ist die S100-Protein-Familie die größte Subklasse der EF-Hand-Proteine, zu denen auch Calmodulin und Troponin C gehören.

S100-Proteine bilden Dimere, welche aus homologen ($\alpha\alpha$, $\beta\beta$) oder heterologen Untereinheiten ($\alpha\beta$) bestehen können. Das Protein ist auf Zellmembranen und im Zytoplasma nachgewiesen worden (Donato et al. 1986). 1981 beschrieben Isobe und Mitarbeiter erstmals die Aminosäuresequenz der α -Untereinheit. Auf dem heutigen Stand der Forschung sind 18 verschiedene Gene auf dem Chromosom 1q21 lokalisiert worden (S100A1-S100A18), die zur α -Untereinheit gehörende Proteine kodieren. Andere Genloci wurden für S100P auf 4p16, S100Z auf 5q14 und S100G auf Xp22 gefunden (Santamaria-Kisiel et al. 2006).

Das Gen für die β -Untereinheit ist dagegen auf dem Chromosom 21 lokalisiert (Allore et al. 1988). Es besteht aus 91 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 10,5kDa (Isobe et al. 1978).

2.3.1.2. Biologische Funktion von S100-Proteinen in der Epidermis

Die einzelnen Proteine der S100-Familie sind in unterschiedlichen Geweben und Zelltypen lokalisiert. In der Epidermis und kultivierten Keratinozyten sind bisher 13 Subtypen gefunden worden (S100A2, S100A3, S100A4, S100A6-S100A12, S100A15). Die Expression von S100P wurde in Meißner-Körperchen und S100 β in Langerhans-Zellen und Melanozyten nachgewiesen. Durch die Bindung von Kalzium-Ionen kommt es zur Konformationsänderung der S100-Proteine, wodurch die Bindung von Zielproteinen ermöglicht wird (Zimmer et al. 2003).

Derzeitige Studien untersuchen potentielle Aufgaben der S100-Proteine bei der epidermalen Wundheilung, Entwicklung von Malignomen, Zelldifferenzierung und Stressantwort. In Keratinozyten wurde eine Beteiligung der S100-Proteine in Entzündungsprozessen entdeckt, wobei eine mögliche Funktion als Chemokine diskutiert wird. Für S100A2, S100A7, S100A8, S100A9, und S100A15 konnten erhöhte Serumwerte bei Psoriasis festgestellt werden. Zusätzlich wird ihnen eine Rolle bei der Remodulierung von Membranen bei der Differenzierung von Keratinozyten zugesprochen. Da einige Proteine, die mit S100 interagieren, Kalziumkanäle formieren, ist eine Regulation der Kalziumhomöostase durch S100-Proteine eine weitere mögliche Funktion. Darüber hinaus wird derzeit die Aufgabe des S100 als Transportprotein für verschiedene Target-Proteine diskutiert (Eckert et al. 2004).

Inhibierende Funktionen besitzen S100-Proteine bei der Phosphorylierung von Eiweißen durch Proteinkinasen und Modulation anderer enzymatischer Aktivitäten, wodurch sie vielfältige Signal-Transduktions-Pathways regulieren. Eine Studie von Baudier et al. (1992) untersuchte die Interaktionen von S100 β und dem Tumorsuppressorprotein p53. Bei Anwesenheit von S100 β wurde die Phosphorylierung von p53 durch die Proteinkinase C inhibiert sowie die Spaltung von p53-Oligomeren induziert. Diese sind jedoch für die zellulären Funktionen des Proteins notwendig. Damit ist S100 β in der Lage den Zellzyklus und Differenzierungsprozesse am G_0 - G_1 /S Übergang zu kontrollieren.

Der Einfluss von S100 β auf die Erhaltung der Zellform und Motilität, durch Interaktionen mit Elementen des Zytoskeletts insbesondere bei der Zusammenlagerung von Mikrotubuli, wurde ebenfalls beschrieben (Santamaria-Kisiel et al. 2006).

2.3.1.3. S100 β als Tumormarker des malignen Melanoms

Das 1965 ursprünglich in Nervengewebe entdeckte S100-Protein, ist im weiteren Verlauf der Forschung in verschiedenen Zellen und Geweben nachgewiesen worden. Neben dem Nachweis von S100 β in Astrozyten und Schwann-Zellen, konnte das Protein auch in den aus diesen Geweben abstammenden Tumoren (Astrozytome, Schwannome, Glioblastome, Ependymome) gefunden werden (van Eldik et al. 1986). Außerhalb des ZNS wurde S100 β in Adipozyten und Chondrozyten (Haimoto et al. 1987) sowie in Chondrosarkomen und Chondroblastomen detektiert (Soder et al. 2006). 1980 wurde S100 erstmals von Gaynor et al. in humanen Melanomzelllinien entdeckt. 1984 beschrieben Kindblom und Mitarbeiter, dass die nachgewiesenen S100-Proteine in malignen Melanomen entweder aus zwei heterologen $\alpha\beta$ - oder homologen $\beta\beta$ -Untereinheiten bestehen. Obwohl polyklonale Antikörper gegen S100 alle Formen von Naevus- und Melanomzellen markieren, zeigten junctionale Naevi und junctionale Nester von Compound-Naevi nur geringe oder fehlende Reaktionen. Bei junctionalen dysplastischen Naevi erhöhte sich die Rate der nachgewiesenen S100 α -Untereinheit. S100 β konnte in dermalen Nestern von Compound- und dysplastischen dermalen Naevi, sowie nach Einsetzen des vertikalen Wachstums bzw. Invasivität melanozytärer Läsionen detektiert werden (Cho et al 1990, Nakajima et al. 1982). Boni et al. (1997) gelang es, die α -Untereinheit genauer zu charakterisieren. Sie wiesen S100A6 in allen 39 untersuchten kutanen Melanomen nach. 9 von 14 Metastasen exprimierten ebenfalls dieses Protein.

In der Studie von Fagnart et al. (1988) wurde beobachtet, dass S100 im Serum von Patienten mit metastasierten Melanomen nachgewiesen werden kann. Seit dem wurden umfangreiche Untersuchungen durchgeführt, um die Aussagekraft des S100-Proteins als potentieller Tumormarker für das maligne Melanom zu prüfen. Zusammenfassend lässt sich aussagen, dass in der Mehrzahl der Studien bei Patienten im Stadium I/II nur gering erhöhte S100-Werte beobachtet wurden (0-9% der S100-Werte über dem Cut-off). Bei Patienten mit lokoregionärer bzw. lymphogener Metastasierung stieg der Anteil S100-positiver Serumproben auf 8,7-33%, bei Patienten im Stadium IV auf 67,9-79,4%. Damit ließ sich ein signifikanter Unterschied zwischen S100-Werten von Patienten mit Metastasierung und ohne vorhandene Tumormasse postulieren (Schultz et al. 1997, Abraha et al. 1997, Bonfrer et al. 1998, Hauschild et al. 1999a, Henze et al. 1997, Guo et al. 1995). Von Schoultz und Mitarbeiter (1996) zeigten, dass die Überlebensrate von Melanompatienten stark mit den gemessenen S100-Serumkonzentrationen assoziiert ist. Für Patienten mit S100-Werten über 0,6 μ g/l

beobachteten sie eine signifikant verminderte Gesamtüberlebenszeit, im Gegensatz zu Patienten mit S100-Werten im Normbereich. Bonfrer et al. (1998) bestätigten dieses Ergebnis. Unter Korrektur des Einflusses der Tumordicke, zeigte sich eine signifikante Korrelation von erhöhten S100-Werten vor Therapiebeginn mit einer verminderten Überlebensrate. Hauschild et al. (1999b) führten Messungen des S100-Proteins bei Melanom-patienten im Stadium IV vor, während und nach Chemo- bzw. Immunochemotherapie durch. 84% der Patienten, die nicht auf die Therapie ansprachen, zeigten erhöhte S100-Konzentrationen. Bei 98% der Patienten mit Remissionen oder stabilen Befunden fiel die Konzentration des Markers ab. Aufgrund dieser Ergebnisse hat sich die Bestimmung des S100 β im Serum zur Identifizierung von Hochrisikogruppen, Therapiemonitoring und zur Nachsorge von Tumorpatienten etablieren können.

2.3.2. MIA (melanoma inhibiting activity)

Das Protein MIA wurde erstmals im Zellkulturüberstand der Melanomzelllinie HTZ-19d von Bogdahn und Mitarbeitern (1989) isoliert. Das 11kDa große Protein wird von Melanomzellen in den Extrazellularraum sezerniert. Nach bisherigen funktionellen Untersuchungen spielt es eine Rolle für die Regulation der Zelladhäsion. Durch MIA wird die Bindung der Tumorzellen an ihre Umgebungsmatrix vermindert, was wiederum die Metastasierung fördert. Physiologisch ist MIA in differenzierten Knorpelzellen nachweisbar, in geringen Konzentrationen auch in gutartigen Naevi. In neoplastischem Gewebe findet sich eine schwache MIA-Expression in Chondrosarkomen, Glioblastomen, Ovarial-, Kolon- und Mamma-Karzinomen (Waldmann et al. 2001).

Als Marker für das maligne Melanom wurde MIA 1997 von der Arbeitsgruppe von Bosserhoff et al. erstmals untersucht. Dabei zeigten 13% bzw. 23% der Patienten im Stadium I bzw. II erhöhte Werte im Gegensatz zu 100% der untersuchten Patienten im Stadium III und IV. Bei den 32 Patienten mit erhöhten MIA-Werten im Stadium I/II, konnten in 15 Fällen Metastasen im weiteren Verlauf nachgewiesen werden, während MIA negative Patienten keine Metastasen entwickelten. Bosserhoff et al. (2000) stellten in ihrer Studie einen signifikanten Zusammenhang zwischen chirurgisch reduzierter Tumorlast bzw. dem Ansprechen auf verschiedene Therapiekonzepte und sinkenden MIA-Werten fest. Bei Progression zeigte sich ein Anstieg des Markers. Stahlecker et al. (2000) konnten ebenfalls zeigen, dass MIA als Verlaufsparemeter und beim Therapiemonitoring signifikante

Ergebnisse liefert. Damit stellt MIA einen serologischen Marker des malignen Melanoms dar, der in der klinischen Anwendung neben dem S100-Protein genutzt werden kann.

2.3.3. Laktatdehydrogenase (LDH)

In einer Vielzahl von Studien wurde die unabhängige prognostische Aussagekraft für erhöhte LDH-Serumkonzentrationen bei Melanom-Patienten im fortgeschrittenen Stadium der Erkrankung beobachtet. Dies führte dazu, dass die Bestimmung von LDH Eingang in die Klassifikation der Tumorstadien nach den AJCC-Richtlinien 2002 gefunden hat. Da es sich jedoch um einen sehr unspezifischen Marker handelt, ist er nur für die Prognoseabschätzung im Stadium IV geeignet. Deichmann et al. (1999) zeigten, dass LDH signifikant erhöht ist bei metastasierten Melanom-Patienten im Stadium III/IV und mit einer verkürzten Überlebensrate assoziiert ist.

LDH, ein Stoffwechsellzym das Pyruvat zu Milchsäure reduziert, wird physiologisch in relativ konstanten Raten vom Körper metabolisiert. Erhöhte LDH-Level deuten auf gesteigerten Zellumsatz hin, wie er bei Gewebeschädigung vorkommt (z. B. Hämolyse, Hepatitis, Myokardinfarkt). Darüber hinaus ist ein Anstieg der Werte bei verschiedenen Tumorerkrankungen, insbesondere im Rahmen einer Metastasierung bzw. eines hohen Zellumsatzes festgestellt worden. Da LDH nicht spezifisch für maligne Melanome ist, sollten insbesondere bei falsch positiven Werten weitere Differentialdiagnosen in Betracht gezogen werden.

2.3.4. sICAM-1 (soluble intercellular adhesion molecule 1)

Zelladhäsionsmoleküle spielen eine wichtige Rolle bei der Metastasierung. Im Tiermodell konnte durch Suppression von ICAM-1 eine Reduzierung der Metastasierungsfähigkeit beobachtet werden. Die Expression des Zelladhäsionsmolekül 1 wird durch Zytokine wie TNF- α und Il-1 stimuliert. Die dadurch induzierte Aggregatbildung von Lymphozyten kann die Überlebenszeit der Tumorzellen im vaskulären System verlängern. Gleichzeitig wird deren Extravasation gefördert (Haass et al. 2005). Darüber hinaus bewirkt die Ausschüttung von ICAM-1 durch Melanomzellen die Hemmung ihrer Lyse durch natürliche Killerzellen (Altomonte et al. 1993).

Bei Patienten mit malignem Melanom wurde für das ICAM-1 eine signifikante Korrelation zum Tumorstadium, zur Progression des Malignoms bzw. dem Metastasierungsrisiko fest-

gestellt (Altomonte et al. 1992, Schadendorf et al. 1996, Wollina et al. 1998). Erhöhte ICAM-Werte sind darüber hinaus mit einer verminderten Überlebensrate assoziiert (Harning et al. 1991). Der Einsatz als Tumormarker ist jedoch kritisch zu betrachten. Viac et al. (1993) sowie Bosserhoff et al. (1997) konnten die positiven Ergebnisse nicht bestätigen. Besonders problematisch ist die generelle Erhöhung von Zelladhäsionsmolekülen im Zusammenhang mit entzündlichen Prozessen wie rheumatoider Arthritis, Asthma, allergischem Exzem, Dermatitis, Uveitis oder Sepsis. Außerdem ist ICAM nicht für die Überwachung von Patienten mit INF- α -Behandlung geeignet, da Interferone und andere Zytokine den Anstieg des Adhäsions-moleküls induzieren (Altomonte et al. 1993).

2.3.5. Tyrosinase

Tyrosinase ist ein Schlüsselenzym bei der Synthese des Melanins. Die Monooxygenase katalysiert die Umwandlung von Tyrosin zu Dopa und von Dopa zu Dopaquinon, den ersten Schritten der Biosynthese. Tyrosinase wird in Melanozyten und Schwann-Zellen exprimiert, welche physiologisch nicht im peripheren Blut vorkommen. Das Vorliegen von Tyrosinase im Blutkreislauf kann daher als Marker für maligne Melanome genutzt werden, die Anschluss an das Gefäßsystem entwickelt haben (Waldmann et al. 2001). Die zunehmende Entdifferenzierung von Pigmentzellen bei der malignen Entartung oder der Progression des Tumors, führt zu häufigerem Auftreten hypo- bzw. amelanotischen Formen (Orlow et al. 1998). Dies kann die Aussagekraft der Tyrosinasebestimmung beeinträchtigen.

Smith et al. (1991) wiesen Tyrosinase-mRNA erstmals im Blut von Melanompatienten mit der Polymerasekettenreaktion nach. Mithilfe dieser Technik können auch geringe Mengen eines gesuchten genetischen Materials im Blut nachgewiesen werden, was die PCR zu einem sehr empfindlichen Verfahren macht. Smith et al. konnten zeigen, dass bei 4 von 7 Patienten mit metastasiertem Melanom Tyrosinase-mRNA im Blut nachweisbar war, im Gegensatz zu negativen Befunden bei gesunden Probanden. Weiterführende Studien ergaben jedoch stark differierende Ergebnisse von 15%-100% positiver Proben im Stadium IV (Gläser et al. 1997, Pittman et al. 1996, Battayani et al. 1995, Brossart et al. 1993). Brownbridge et al. (2001) berichteten über 65% positive Proben im Stadium IV. Allerdings beobachteten sie weiterhin, dass der Nachweis von Tumorzellen kein kontinuierliches Phänomen darstellt. Wird ein Patient als Tyrosinase-positiv bewertet, sobald in einer von mehreren sequentiell untersuchten Proben die gesuchte mRNA vorhanden ist, liegt die Rate bei 81%.

Der prognostische Nutzen der Bestimmung von Markern mittels PCR bleibt weiter umstritten. Es liegen sowohl Arbeiten mit nachgewiesenem statistischem Zusammenhang, als auch gegenteilige Ergebnisse vor. Palmieri et al. (2003) fassen in ihrem Artikel kurz die Resultate aktueller Studien zusammen. In ihrer eigenen Untersuchung, mit Verwendung von multiplen Markern für die PCR und einem medianen Beobachtungszeitraum von 44 Monaten, konnten sie keinen signifikanten prognostischen Zusammenhang nachweisen. Als ein Grund für diese Variabilität werden Unterschiede in den Untersuchungstechniken und die geringe Menge an bestimmender Tyrosinase-mRNA im peripheren Blut diskutiert. In einer interlaboratorischen Studie von Reinhold et al. (2001) zeigte sich außerdem eine geringe Reproduzierbarkeit der mithilfe PCR gemessenen Werte.

2.3.6. Melan A/MART 1

Werden Lymphozyten in vitro durch autologe Melanomzellen und Il-2 stimuliert, kommt es zur Immunantwort mit Bildung von zytotoxischen T-Lymphozyten. Diese interagieren mit spezifischen Strukturen der Melanomzellen und führen zu deren Lyse. Melan A ist als eines der Antigene identifiziert worden, durch welches die Bildung von spezifischen zytotoxischen T-Zellen induziert wird. Melan A bzw. MART-1 (melanoma antigen recognized by T cells 1) wurde 1994 zeitgleich von zwei verschiedenen Arbeitsgruppen beschrieben (Coulie et al. 1994, Kawakami et al. 1994). Das Protein wird in Melanozyten, melanozytären Naevi, Melanomen, Steroidhormone produzierenden Geweben (z. B. Tumoren der Nebennierenrinde, Leydig-Zellen, Ovarien), Angiomyolipomen, bei Lymphangiomyomatose und Klarzelltumoren der Lunge exprimiert (Busam et al. 1999). Sarantou und Mitarbeiter (1997) untersuchten 35 Blutproben von Patienten insbesondere im Stadium III und IV und zeigten, dass die Sensitivität für die Bestimmung von Tyrosinase und Melan A vergleichbar ist (86% bzw. 83%).

Schittek et al. (1999) untersuchten 340 Blutproben auf Tyrosinase-mRNA. Durch die zusätzliche Bestimmung von Melan A konnte die Sensitivität des Verfahrens um 30% gesteigert und ein 2,4fach erhöhtes Risiko zur Entwicklung von Metastasen ermittelt werden. Untersuchungen von Brownbridge et al. (2001) konnten diese Ergebnisse nicht bestätigen. In der Studie von Palmieri et al. (2003) zeigte sich ein signifikanter Zusammenhang zwischen Tumorstadium und Melan A Expression (28-33% Melan A positive Patienten in Stadium I-III, 61% im Stadium IV). Ein signifikanter prognostischer Zusammenhang konnte jedoch nicht postuliert werden.

3. Zielstellung

In den vergangenen Jahrzehnten ist die Inzidenz des malignen Melanoms, mit Zuwachsraten von ca. 3%/Jahr, rasant gestiegen. So hat sich die Zahl der jährlich neu diagnostizierten Melanome in den letzten 30 Jahren verdreifacht. Auch in den nächsten Jahrzehnten ist durch Umweltfaktoren (UV-Exposition), verändertes Freizeitverhalten und der demografischen Entwicklung der Bevölkerung mit einer deutlichen Zunahme des malignen Melanoms zu rechnen. Um trotz steigender Patientenzahlen die Mortalität der Erkrankung zu stabilisieren bzw. zu senken, müssen die Nachsorgekonzepte effizient gestaltet werden. Dabei müssen neben diagnostischen, therapeutischen sowie sozialen Herausforderungen, auch logistische und ökonomische Aspekte in Betracht gezogen werden.

Eine für den Patienten nur gering invasive und kostengünstige Methode zur Überwachung des Krankheitsverlaufes ist die Bestimmung von Tumormarkern im Blut. Der etablierteste Marker des malignen Melanoms ist das S100-Protein im Serum von Melanompatienten. Assays zur Bestimmung von S100 β werden von diversen Firmen angeboten. Sie unterscheiden sich in der Durchführung, den Analyseprinzipien und den verwendeten Antikörpern. In der nachfolgenden Arbeit wurden drei Assays getestet und in ihren Ergebnissen verglichen: den Elecsys®1010 ECLIA von Roche Diagnostics, den CanAg S100 EIA von DakoCytomation und den Sangtec®100 ELISA von DiaSorin.

Folgende Fragestellungen wurden untersucht:

1. Korrelieren die mit drei verschiedenen Methoden ermittelten S100-Konzentrationen im Serum der Patienten miteinander?
2. Ergibt sich ein signifikanter Zusammenhang zwischen den gemessenen S100-Werten und dem Stadium der Melanomerkrankung?
3. Können statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Testergebnissen der einzelnen Verfahren beobachtet werden?
4. Welches Verfahren besitzt in Bezug auf das Kollektiv der Melanompatienten der Klinik für Dermatologie und dermatologisch Allergologie in Jena die größte diagnostische Aussagekraft?

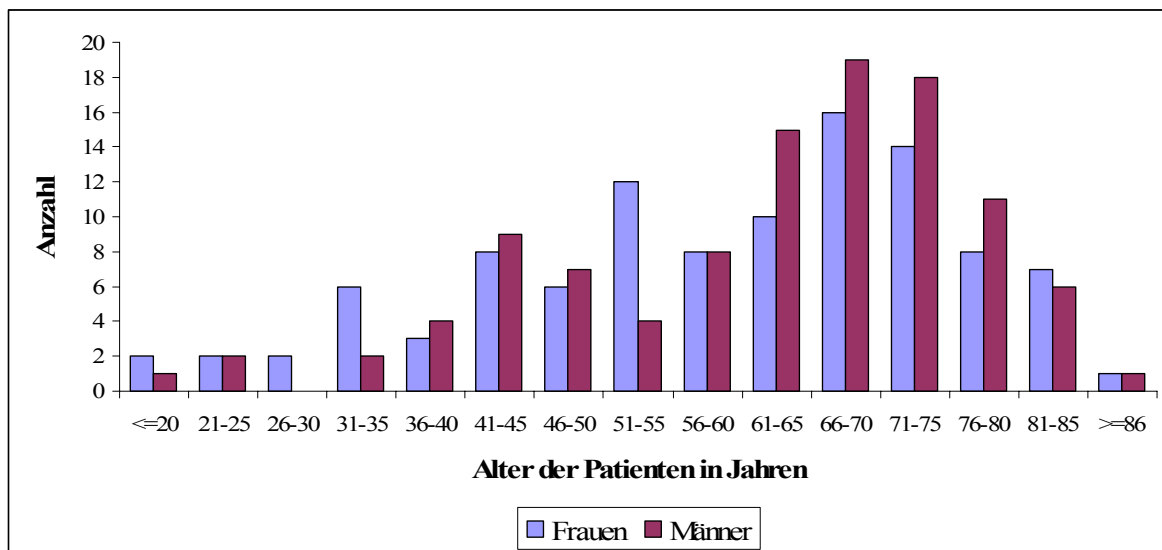
4. Material und Methoden

4.1. Patienten

Für den Vergleich von drei verschiedenen Verfahren zur Bestimmung des S100-Proteins wurden 310 Blutproben von 212 Patienten gewonnen, die sich von März 2005 bis Oktober 2005 in der Melanomsprechstunde zur Tumornachsorge vorstellten bzw. sich in stationärer Betreuung an der Klinik für Dermatologie und dermatologische Allergologie der Friedrich-Schiller-Universität in Jena befanden.

Die jüngste Patientin war zum Zeitpunkt der Probenentnahme 16 Jahre alt, die älteste 92 Jahre. Der Mittelwert liegt bei 60,75 Jahren mit einer Standardabweichung von $\pm 15,68$ Jahren (Abb.1), der Median bei 64,5 Jahren. 50,5% der untersuchten Patienten sind männlichen, 49,5% weiblichen Geschlechts (berechnet mithilfe SPSS®).

Abb.1: Altersverteilung der untersuchten Patienten



In unserer Studie wurden 117 Serumproben mit drei verschiedenen Verfahren parallel analysiert, d. h. mit dem Elecsys®1010 ECLIA von Roche Diagnostics, dem CanAg S100 EIA von DakoCytomation und Sangtec®100 ELISA von DiaSorin. Weitere 193 Serumproben wurden jeweils nur mit den Assays von Roche Diagnostics und DiaSorin parallel untersucht. Eingeschlossen wurden Patienten aller Tumorstadien nach der AJCC-Klassifikation 2002 (Tab. 8).

Tab. 8: Häufigkeitsverteilung der erfassten Tumorstadien nach AJCC 2002

Stadium nach AJCC 2002	Vergleich DakoCytomation - DiaSorin – Roche Diagnostics		Vergleich Roche Diagnostics - DiaSorin	
	Anzahl n	Häufigkeit in %	Anzahl n	Häufigkeit in %
0 (in situ)	1	0,9	4	1,3
Ia	13	11,1	33	10,7
Ib	30	25,6	76	24,5
IIa	13	11,1	39	12,6
IIb	13	11,1	27	8,7
IIc	7	6,0	24	7,7
III	18	15,4	53	17,1
IV	20	17,1	46	14,8
Nicht bestimmbar	2	1,7	8	2,6
Summe	117	100	310	100

Tab. 9 zeigt eine Übersicht über die aktuell nachweisbare Tumorausbreitung der untersuchten Patienten unabhängig vom Stadium. 17,9% bzw. 17,1% der untersuchten Proben wurden von Patienten mit aktuell nachweisbarer Metastasierung gewonnen. 7,7% bzw. 5,5% wiesen zum Zeitpunkt der Probenentnahme Metastasen in mindestens zwei verschiedenen Organsystemen auf. Isolierte pulmonale Metastasen konnten bei 3,4% bzw. 3,2% nachgewiesen werden. Eine regionäre Metastasierung in Lymphknoten und Haut wurde in 3,4% bzw. 5,8% der Fälle diagnostiziert.

Tab. 9: Übersicht über die Häufigkeitsverteilung der Tumorausbreitung

Metastasierung bzw. Tumorlast	Vergleich DakoCytomation - DiaSorin – Roche Diagnostics		Vergleich Roche Diagnostics - DiaSorin	
	Anzahl n	Häufigkeit in %	Anzahl n	Häufigkeit in %
Kein Tumor aktuell nachweisbar	93	79,5	249	80,3
Lokalrezidiv	3	2,6	5	1,6
Reg. LK-, In- Transit-, Satelliten- u./o. Mikro-MTS	4	3,4	18	5,8
LK-Fern-MTS	2	1,7	4	1,3
Leber-MTS	0	0	3	1,0
Lungen-MTS	4	3,4	10	3,2
Haut-Fern-MTS	2	1,7	4	1,3
Multiple MTS	9	7,7	17	5,5
Summe	117	100	310	100

Die Nachsorgeuntersuchungen zum Nachweis von Metastasen wurden gemäß den Leitlinien der Arbeitsgemeinschaft Dermatologische Onkologie durchgeführt (siehe Abschnitt 2.1.8). Sie umfassen sowohl die inspektorische Untersuchung des gesamten Integuments als auch bildgebende Verfahren, wie Sonografie der Lymphknoten, Röntgen-Thorax-Aufnahmen oder weiterführende apparative Untersuchungen (CT, MRT, PET, Skelettszintigrafie) in Abhängigkeit vom Tumorstadium und aktuellen Befunden.

4.2. Material

Insgesamt wurden 310 Blutproben untersucht. Durch Zentrifugation erfolgte die Teilung der Blutprobe in korpuskuläre Bestandteile und Serum, welches für die Analyse benötigt wird. Da das S100-Protein aus jeweils zwei Untereinheiten besteht, werden sowohl homologe $\beta\beta$ -Dimere als auch $\alpha\beta$ -Dimere bei der Bestimmung der S100-Konzentration erfasst.

4.3. Untersuchungsverfahren zur Bestimmung des S100 β

4.3.1. Enzymimmunoassay (EIA) CanAg S100

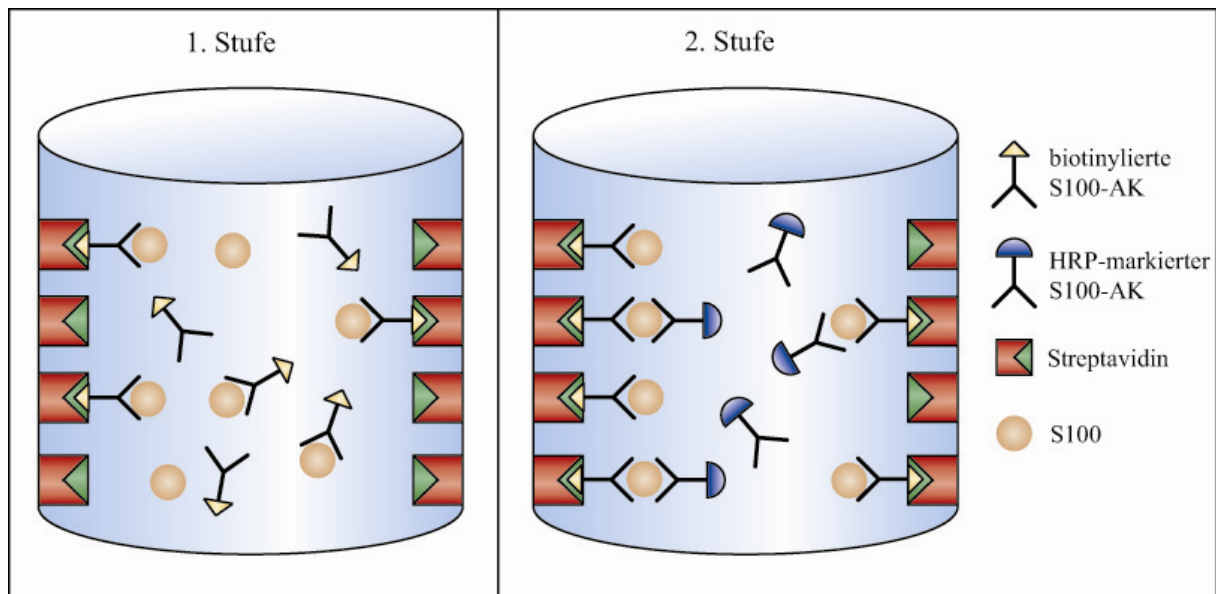
(DakoCytomation, Hamburg; CanAg Diagnostics AB, Göteborg, Schweden)

Testprinzip:

Der EIA ist ein zweistufiger, nicht-kompetitiver Festphasen-Immunoassay, der auf zwei monoklonalen Maus Anti-S100 β -AK beruht. Diese sind jeweils gegen ein anderes Epitop des S100 β -Proteins spezifisch. In der ersten Stufe werden die Kalibratoren mit festgelegter Konzentration von bovinem S100 β und die Serumproben mit biotinyliertem Anti-S100-AK S23 in Streptavidin-beschichteten Mikrotiterwells inkubiert. Durch die Bildung eines Biotin-Streptavidin-Komplexes wird das im Untersuchungsmaterial enthaltene S100-Protein an die Festphase (Mikrotiterplatte) gebunden. In Stufe zwei entsteht nach Zugabe des zweiten, an Peroxidase gekoppelten Anti-S100 β -AK S53 der Sandwich-Komplex (Abb. 2).

Nichtgebundene Anteile des Probenmaterials und freie Antikörper werden jeweils durch Waschprozesse entfernt. Nach Zugabe von Substrat-Chromogen-Reagenz, welches von der Peroxidase metabolisiert wird, zeigt die Intensität der Blaufärbung die Konzentration des S100-Proteins an. Nach Zugabe der Stopplösung kann die Farbintensität durch Messung der Absorptionswerte bei einer Wellenlänge von 405nm bestimmt werden. Sie ist zur S100 β -Menge direkt proportional.

Abb. 2: Schematische Darstellung des Testprinzips des CanAg S100 von Dako (erstellt nach der Gebrauchsanweisung des CanAg S100 EIA von Dako Cytomation)



Reagenzien:

- Streptavidin-beschichtete Mikrotiterplatte
- 6 Kalibratoren: vor Verwendung mit 0,1ml destilliertem Wasser rekonstituieren
- Biotin Anti-S100: biotinylierter monoklonaler Anti-S100-AK S23 (Fängerantikörper) von Mäusen
- Tracer, HRP Anti-S100: Stammlösung von HRP (horseradish-peroxidase)-markierten monoklonalen Anti-S100-AK S53 (detektierender AK) von Mäusen, vor Gebrauch mit Tracer Diluent verdünnen (für 96 Wells 600µL Tracer und 12mL Tracer Diluent)
- Tracer Diluent: gebrauchsfertige Verdünnungslösung
- TMB-HRP-Substrat: enthält gepuffertes Wasserstoffperoxid und 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
- Stopplösung: enthält 0,12M Salzsäure, gebrauchsfertig
- Waschkonzentrat: enthält eine Tris-HCl-gepufferte Salzlösung mit Tween 20, vor Gebrauch 25fach mit destilliertem Wasser verdünnen (50mL Konzentrat mit 1200mL destilliertem Wasser)

Zusätzliche Materialien:

- Präzisionspipetten (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland)
- Schüttler für Mikrotiterplatten (IKA® MTS 2, IKA® Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Deutschland)

- Waschvorrichtung für Mikrotiterplatten (Modell Columbus™, Tecan/SLT Labinstrumente Deutschland GmbH, Crailsheim)
- Spektrophotometer für Mikrotiterplatten mit 405nm-Filter (FluoStar Galaxy, BMG LABTECH GmbH, Offenburg, Deutschland)

Testdurchführung:

1. Vorbereitung der Kalibratoren, Waschlösung und Tracer-Arbeitslösung wie oben beschrieben
2. Mikrotiterplatte einmalig mit Waschlösung waschen
3. 50µL Patientenproben und Kalibratoren in Wells pipettieren
4. Zugabe von 100µL Biotin Anti-S100, Inkubation: 2h bei Raumtemperatur (RT) unter konstantem Schütteln
5. 3 Waschvorgänge durchführen
6. Zugabe von 100µL Tracer-Arbeitslösung, Inkubation: 1h bei RT unter konstantem Schütteln
7. 6 Waschvorgänge durchführen
8. 100µL TMB-HRP-Substrat schnellstmöglich in die Wells pipettieren, Inkubation: 30 min bei RT unter konstantem Schütteln
9. Zugabe von 100µL Stopplösung, innerhalb 15min Messung der Extinktionswerte bei 405nm

Der Messbereich liegt zwischen 0,01-3,5µg/L. Proben mit erwarteten S100β-Konzentrationen oberhalb dieser Grenze sollten, nach Empfehlung des Herstellers, verdünnt und noch einmal gemessen werden. Mit Hilfe der Kalibratoren erfolgt die Berechnung einer spezifischen Eichkurve, anhand derer die S100-Werte der untersuchten Proben berechnet werden können. Die Qualitätskontrolle erfolgt durch Mitführung von Kontrollproben mit definierten Konzentrationen. Der Referenzbereich umfasst 95% der um den Mittelwert verteilten Werte gesunder Probanden. Der Cut-off entspricht demnach dem 97,5%-Fraktil. Der Referenzbereich beträgt 0,025-0,091µg/L und wurde durch Messung von 94 Blutproben gesunder Probanden durch den Hersteller ermittelt.

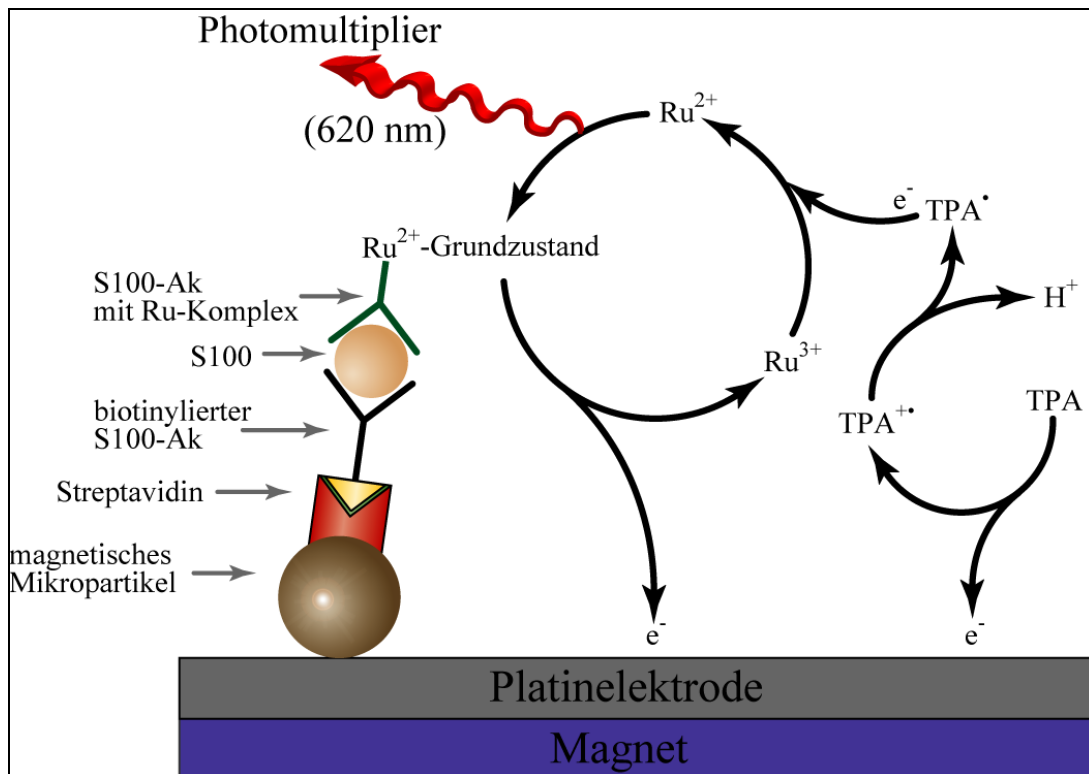
4.3.2. Elektro-Chemi-Lumineszenz-Immuno-Assay (ECLIA) Elecsys®1010

(Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland)

Testprinzip:

20 µl der Serumprobe, der biotinylierter monoklonaler Anti-S100β-AK S23 und der mit einem Ruthenium-Komplex markierte monoklonale Anti-S100β-AK S53 werden inkubiert. Sie bilden mit dem S100-Protein einen Sandwich-Komplex. Nach Zugabe von Streptavidin beschichteten Mikropartikeln wird der Komplex über Biotin-Streptavidin Wechselwirkungen an die Festphase (Mikropartikel) gebunden. Das Reaktionsgemisch wird in die Messzelle des Elecsys® 1010 überführt, die einen ähnlichen Aufbau wie bei der Durchflusszytometrie aufweist. Die Mikropartikel werden passager durch magnetische Anziehung auf der Oberfläche der Elektrode fixiert. Ungebundenes Substrat wird durch einen zeitgleich ablaufenden Waschgang entfernt. Im nächsten Schritt wird durch Anlegen einer definierten Spannung die Elektrochemilumineszenzreaktion induziert (Abb. 3).

Abb. 3: Schematische Darstellung des Testprinzips des Elecsys®1010 ECLIA von Roche Diagnostics (modifiziert nach Roche Diagnostics 2005, Product Information Elecsys®S100)



Die angelegte Spannung führt zur Oxidation des Ruthenium-Komplexes. Durch eine gleichzeitige Oxidation von Tripropylamin (TPA), das im Reaktionsgemisch im Überschuss vorliegt, werden Kation-Radikale gebildet. Durch die spontane Abgabe eines Protons entstehen freie Elektronen. Die freien Elektronen werden auf den Rutheniumkomplex übertragen und versetzen diesen in einen angeregten Zustand. Beim spontanen Rückgang des Rutheniums vom angeregten in den Grundzustand wird ein Photon (Lichtenergie) abgegeben und vom Photomultiplier in relativen Lichteinheiten (RLU, relative light units) registriert. Die Spannung bleibt 1,4s angelegt. Für die Messung wird das über einen Zeitraum von 0,02-0,42s detektierte Signal integriert. Die Berechnung der S100 β -Konzentration erfolgt über die Bestimmung einer Eichkurve.

Reagenzien:

- M: Streptavidin beschichtete Mikropartikel: Streptavidin beschichtete Mikropartikel, 0,72mg/mL, Bindekapazität: 470mg Biotin/mgMikropartikel
- R1: Anti-S100-AK-Biotin: Biotinylierter monoklonaler Anti-S100-AK (Maus) S23, 1,0mg/L
- R2: Anti-S100-AK~Tris(2,2bipyridyl)ruthenium(II)-Komplex: Monoklonaler Anti-S100-AK (Maus) S53 markiert mit Ruthenium-Komplex 1,0mg/L
- S100 CalSet Elecsys® Kalibratoren
- Preci-Control S100 1 und 2 Elecsys® Kontrollproben
- ProCell Elecsys® Systempuffer
- CleanCell Elecsys® Meßzellen-Reinigungslösung
- SysClean Elecsys® Systemreinigungslösung
- Elecsys®1010

Die Reagenzien sind gebrauchsfertige Lösungen und zu einer untrennbaren Einheit zusammengefügt. Die Proben werden bei Raumtemperatur in den Reagenzrotor platziert. Öffnen und Schließen der Flaschendeckel erfolgt manuell vor Beginn der Untersuchung. Die Analyse der Proben erfolgt vollautomatisch im Elecsys®1010 bei einer Testdauer von 18 Minuten. Die Ermittlung der Eichkurve zur Berechnung der S100 β -Konzentrationen wird durch das Mitführen von Kalibratoren (S100 CalSet Elecsys®) ermöglicht. Eine Qualitätskontrolle erfolgt durch Kontrollproben unterschiedlicher S100 β -Konzentrationen. Die Berechnung der Konzentration in $\mu\text{g/L}$ erfolgt automatisch. Der Messbereich definiert sich durch die analytische Nachweisgrenze und das Maximum der Masterkurve. Er beträgt 0,005-39 $\mu\text{g/L}$. Als Cut-off gilt die 95. Perzentile prinzipiell gesunder Erwachsener von

0,105µg/L und wurde durch die Untersuchung von 206 gesunden Probanden durch den Hersteller ermittelt.

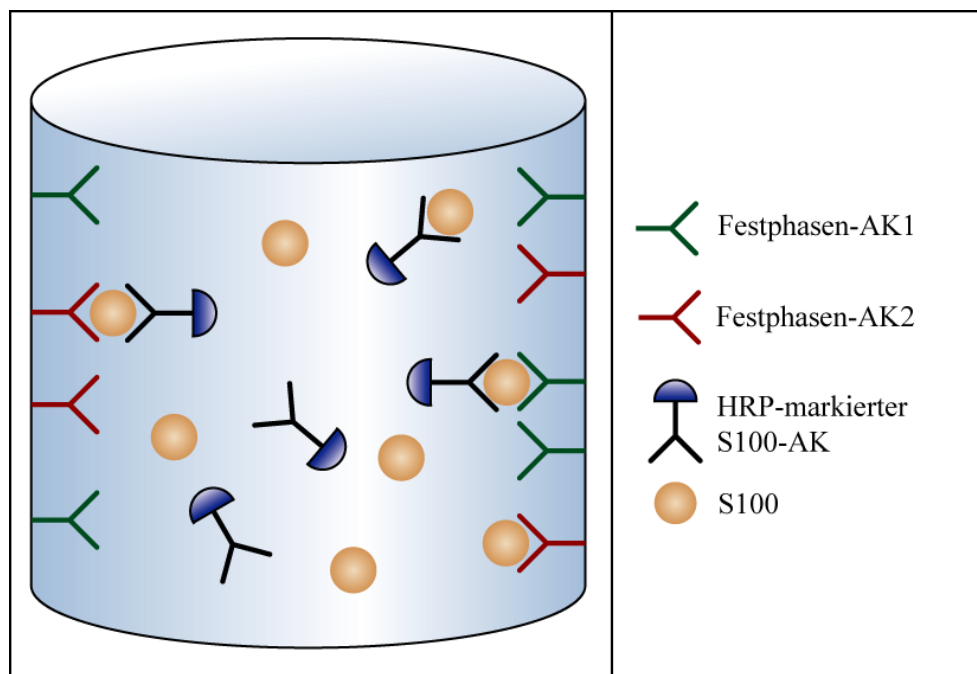
4.3.3. Enzyme-Linked-Immunosorbent-Assay (ELISA) Sangtec®100

(DiaSorin Deutschland GmbH, Dietzenbach)

Testprinzip:

Bei diesem Assay reagieren in den Mikrotiterwells während der Inkubation Kalibratoren, Kontrollen und unbekannte Proben gleichzeitig mit zwei Festphasen-Beschichtungs-AK (SMSK25 und SMSK28) und einem mit Meerrettich-Peroxidase (HRP) konjugierten Detektorantikörper SMST12 (Abb. 4). Nach einem Spülschritt zur Entfernung ungebundener Substanzen wird TMB-Chromogen-Substrat hinzugegeben und die Reaktion 15min fortgesetzt. Nach Zugabe der Stopplösung wird der Absorptionswert bei einer Wellenlänge von 450nm gemessen.

Abb. 4: Schematische Darstellung des Testprinzips des Sangtec®100 ELISA von DiaSorin (erstellt nach der Produktinformation des Sangtec®ELISA von DiaSorin)



Reagenzien und benötigte Materialien:

- Mit 2 Maus Anti-S100 β -AK (SMSK25, SMSK28) beschichtete Mirkotiterwells
- HRP-Konjugat: enthält mit HRP (horseradish peroxidase) konjugierten monoklonalen Anti-S100 β -AK (SMST12)
- 6 Kalibratoren: enthalten bovines S100 β -AG, vor Gebrauch in 1,0mL destilliertem Wasser rekonstituieren
- Proben-Diluent
- Kontrollen: enthalten bovines S100 β -AG, vor Gebrauch in 1,0mL destilliertem Wasser rekonstituieren
- Waschpuffer: PBS (Phosphat-gepufferte Salzsäure)-Tween-Konzentrat, vor Gebrauch 1:10 mit destilliertem Wasser verdünnen
- TMB-Lösung: gepuffertes Substrat und Chromogen, enthält 0,05% TMB (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin)
- Stopplösung: enthält 0,4M Schwefelsäure
- Mikroplatten-Spektrophotometer mit Filter bei 450nm

Testdurchführung:

1. Vorbereitung der Reagenzien wie oben beschrieben
2. 50 μ L der Kalibratoren, Kontrollen und Serumproben in die Wells pipettieren
3. Zugabe von 150 μ L Konjugat, Inkubation über 2h bei RT auf dem Plattenschüttler
4. Dreimal mit 300 μ L Waschpuffer spülen
5. Zugabe von 100 μ L TMB-Substrat, Inkubation für 15min bei RT auf dem Plattenschüttler
6. Reaktion durch Zugabe von 100 μ L Stopplösung beenden; Stopplösung in derselben Reihenfolge und Geschwindigkeit wie das TMB-Substrat hinzugeben
7. Den Absorptionswert innerhalb von 15min bestimmen

Die Berechnung der S100-Werte in μ g/L erfolgt durch die anhand der mitgeführten Kalibratoren ermittelten Eichkurve. Die Qualitätskontrolle erfolgt durch Mitführen von Kontrollproben mit hoher und niedriger S100 β -Konzentration mit festgelegten Sollbereichen. Als Cut-off wurde ein Wert von 0,15 μ g/L bestimmt (95. Perzentile von 100 Proben gesunder Blutspender). Der Messbereich beträgt 0,03-5 μ g/L. Konzentrationen für Proben mit höheren Werten können durch Verdünnung mit Diluent-Lösung und der Wiederholung des Tests erhalten werden.

4.4. Statistik

Die Aufarbeitung und statistische Auswertung der Untersuchungsergebnisse erfolgte unter Verwendung von Microsoft Excel® 2003 (Microsoft Corporation, Redmond, Washington, USA) und SPSS® 14.0 für Windows (SPSS Inc. Headquarters, Chicago, Illinois, USA).

Zum Vergleich der erhaltenen Testergebnisse der drei Verfahren wurde der McNemar-Test verwendet unter Vorschaltung des Cochran-Test. Der Cochran-Test ist eine Erweiterung des McNemar-Tests, mit dem im Gegensatz zu diesem zwei abhängige Stichproben mit mehr als zwei binären Merkmalen miteinander verglichen werden können. Mit Hilfe des Tests kann vorab festgestellt werden, ob es zwischen den drei angewendeten Untersuchungsmethoden einen statistischen Unterschied gibt. Der nachfolgend durchgeführte McNemar-Test ermöglicht den Vergleich der Verfahren untereinander. Allerdings können nur jeweils zwei der Methoden gleichzeitig verglichen werden. Testvoraussetzung sind zwei abhängige Stichproben mit einem alternativ verteiltem binärem Merkmal (Merkmal mit nur zwei möglichen Realisierungen). Dafür ist es notwendig mithilfe eines festgelegten Cut-offs, die gemessenen Serumkonzentrationen in Test-positive (oberhalb des Cut-offs) und Test-negative Ergebnisse einzuteilen. Mit dem McNemar-Test werden die Häufigkeiten der Resultate, in denen die zu vergleichenden Testverfahren voneinander abweichen (z .B. Test A positiv, Test B negativ), ins Verhältnis gesetzt. Der Test ist zweiseitig, d .h. es kann nur festgestellt werden, ob ein signifikanter Unterschied besteht, nicht jedoch in welcher Richtung die Abweichung erfolgt (Vollandt 2003). Die statistische Signifikanz wird durch Berechnung der p-Werte ($p = \text{probability}$, Wahrscheinlichkeit) ermittelt. Der p-Wert bezieht sich auf die Nullhypothese, d.h. die Annahme, dass kein signifikanter Unterschied vorliegt. Geringe Werte für p führen zur Ablehnung der Nullhypothese und werden als Nachweis eines statistischen Zusammenhangs gewertet. Die Signifikanzgrenze wird für $p < 0,05$ festgelegt.

Zusätzlich erfolgte die Berechnung von Spezifität, Sensitivität, als Prävalenz-unabhängige Maßzahlen der Validität eines diagnostischen Tests (Vollandt 2003). Unter Sensitivität versteht man die Wahrscheinlichkeit, dass ein Erkrankter Test-positiv ist.

$$\text{Sensitivität} = \frac{\text{Anzahl der richtig positiven Testergebnisse}}{\text{Anzahl der untersuchten Erkrankten}}$$

Unter Erkrankte zählen in diesem Zusammenhang jene Patienten, bei denen zum Zeitpunkt der Blutentnahme Metastasen nachweisbar waren. Unter Spezifität versteht man die Wahrscheinlichkeit, dass ein Gesunder Test-negativ ist.

$$\text{Spezifität} = \frac{\text{Anzahl der richtig negativen Testergebnisse}}{\text{Anzahl der untersuchten Gesunden}}$$

Unter Gesunden wird in diesem Zusammenhang die Gruppe der Patienten betrachtet, welche sich zum Zeitpunkt der Blutentnahme in kompletter Remission befanden. Um eine Aussage über die klinische Verwertbarkeit des Testergebnisses treffen zu können, erfolgt die Berechnung von Vorhersagewerten. Der positive prädiktive Wert gibt an, wie hoch die Wahrscheinlichkeit ist, dass ein Test-positiver Patient wirklich erkrankt ist.

$$\text{Positiver prädiktiver Wert} = \frac{\text{Anzahl der Kranken mit richtig positivem Testergebnis}}{\text{Anzahl aller positiven Testergebnisse}}$$

Unter negativem prädiktivem Wert versteht man die Wahrscheinlichkeit, dass ein Test-negativer Proband gesund ist.

$$\text{Negativer prädiktiver Wert} = \frac{\text{Anzahl der Gesunden mit negativem Testergebnis}}{\text{Anzahl aller negativen Testergebnisse}}$$

Die Vorhersagewerte sind abhängig von der Prävalenz. Sie gelten daher nur für die untersuchte Population und sind nicht allgemein für den diagnostischen Test gültig.

Die Bewertung der Testverfahren unabhängig vom Cut-off erfolgt mit Hilfe der Berechnung von ROC-Kurven (receiver operating characteristic). Durch Festlegung eines Cut-offs wird der metrische Diagnostest zur Bestimmung der S100-Konzentration zu einem binären Test für den sich Sensitivität und Spezifität berechnen lässt. Für unterschiedliche Cut-offs ergeben sich hierbei unterschiedliche Ergebnisse, welche als ROC-Kurve dargestellt werden können. Untersucht wird die Trennschärfe der Testverfahren, d. h. wie gut kann der Test zwischen kranken und gesunden Probanden unterscheiden. Die Fläche unter der Kurve veranschaulicht den Informationsgewinn durch Anwendung des Tests gegenüber einer Zufallszuweisung, deren ROC-Kurve die Winkelhalbierende ist.

Die Beurteilung, ob der Informationsgewinn bei der Bestimmung des S100 β mit Hilfe der einzelnen Verfahren statistisch signifikant ist, erfolgt durch den Wilcoxon-Mann-Whitney-Test für zwei unabhängige Stichproben. In diesem Fall wird der Test zum Vergleich der Werte von Patienten mit und ohne nachweisbare Metastasierung angewandt. Außerdem werden die Daten auf signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Tumorstadien überprüft. Bei der Durchführung des Tests werden den ermittelten S100-Konzentrationen Ränge zugeordnet. Für die Testentscheidung wird die Summe der Rangzahlen für die zu vergleichenden Stichproben und die jeweilige mittlere Rangsumme betrachtet. Das Signifikanzniveau α wird ebenfalls bei 0,05 festgelegt (Vollandt 2003).

Für die Korrelationsanalyse der metrischen Daten wurde der Stichproben-Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman (r_s) mithilfe SPSS® berechnet. Mit r_s kann die Korrelation auch für nicht-metrische Daten bestimmt werden. Ein linearer Zusammenhang wird nicht vorausgesetzt. Aussagen über Kausalitäten können nicht getroffen werden.

Die Ergebnisse der Korrelationsanalysen werden wie folgt interpretiert:

$r_s = 0$ Die Werte korrelieren nicht miteinander

$0 < |r_s| < 0,3$ Es besteht ein schwacher monotoner Zusammenhang.

$0,3 \leq |r_s| \leq 0,7$ Es besteht ein mittlerer monotoner Zusammenhang.

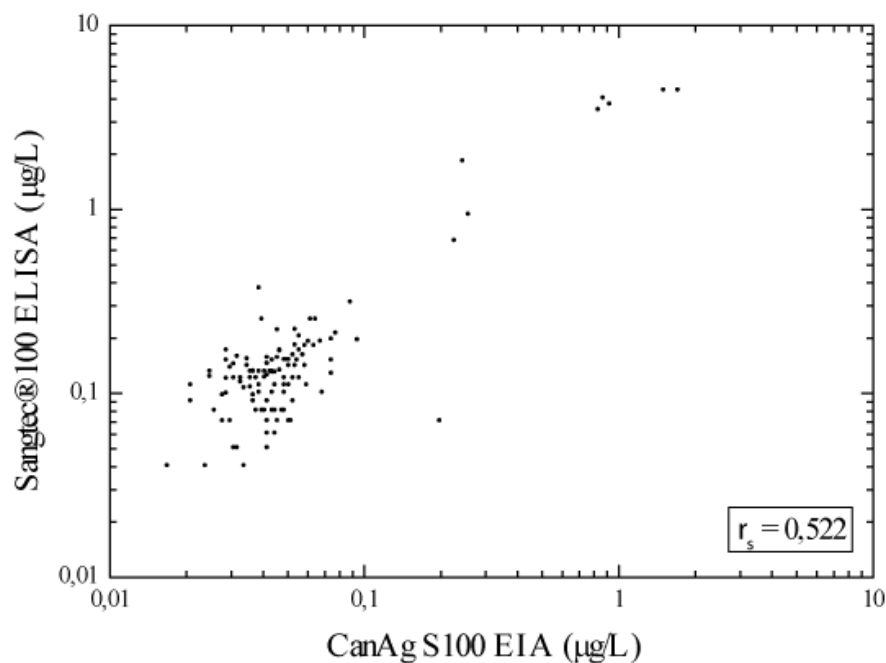
$0,7 < |r_s| \leq 1$ Es besteht ein starker monotoner Zusammenhang.

5. Ergebnisse

5.1. Korrelationsanalysen

Zunächst erfolgte die Darstellung der ermittelten Konzentrationen des S100-Proteins jeweils in Abhängigkeit von den ermittelten Konzentrationen des anderen verwendeten Verfahrens in einem Punktdiagramm (Abb. 5-7)

Abb. 5: Punktdiagramm zum Vergleich der Serum-S100-Konzentration gemessen mit dem CanAg S100 von DakoCytomation und dem Sangtec®100 ELISA von DiaSorin



Anhand dieser und der folgenden zwei Grafiken wird deutlich, dass die Mehrheit der Messwerte im niedrigen Konzentrationsbereich bis 0,2µg/L liegt mit nur wenigen Werten höherer Konzentration. Zur besseren Übersicht der Ergebnisse wird die logarithmische Einteilung der Achsen gewählt. Grundsätzlich gehen erhöhte S100-Konzentrationen gemessen mit einem Verfahren jeweils mit erhöhten Werten des anderen Verfahrens einher. Die Berechnung der entsprechenden Regressionsgeraden ist nicht sinnvoll. Ihre Aussagekraft ist durch große Abweichung der Werte von der Geraden eingeschränkt.

Abb. 6: Punktdiagramm zum Vergleich der Serum-S100-Konzentration gemessen mit dem Elecsys®1010 von Roche und dem Sangtec®100 ELISA von DiaSorin

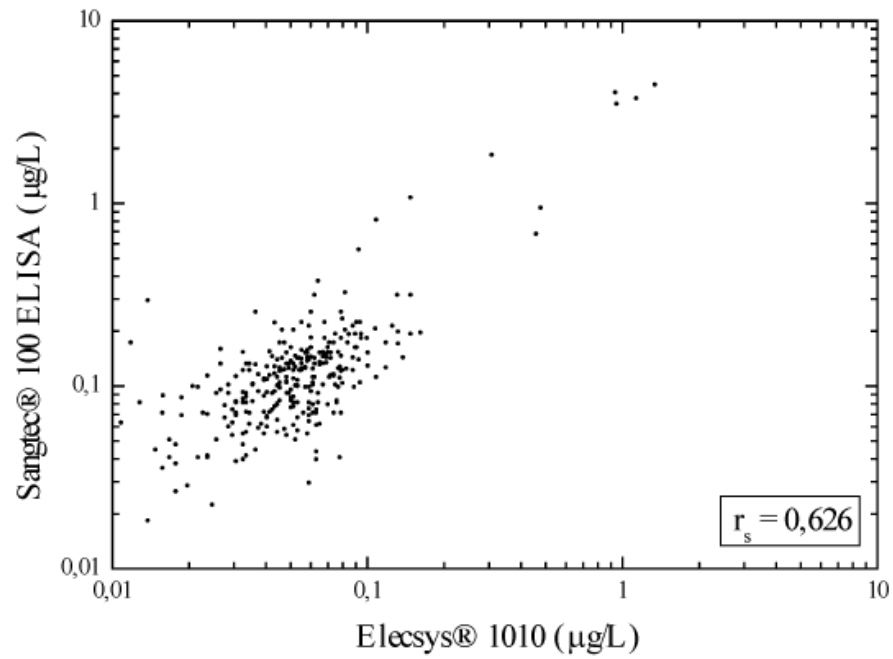
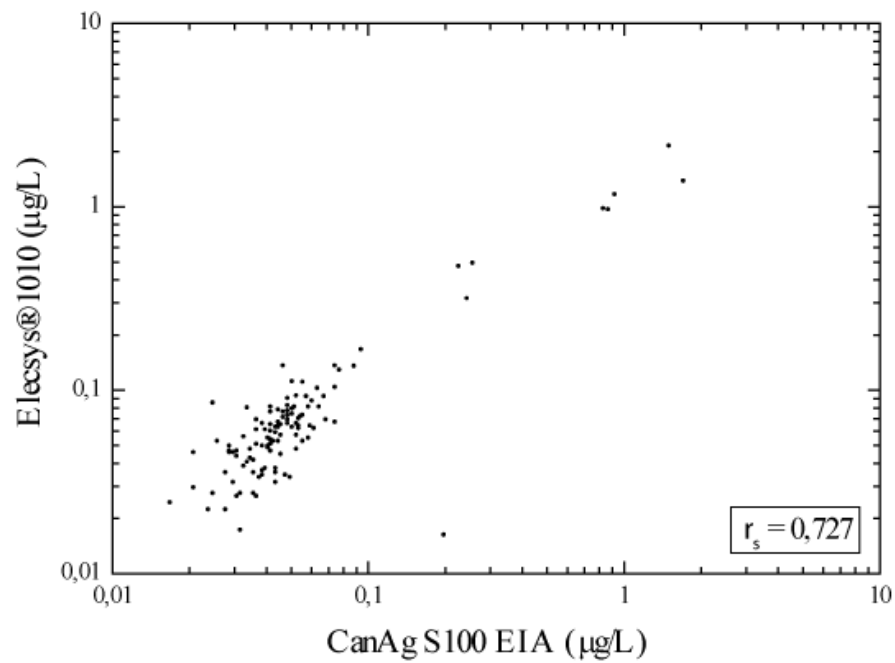


Abb. 7: Punktdiagramm zum Vergleich der Serum-S100-Konzentration gemessen mit dem CanAg S100 DakoCytomation und dem Elecsys®1010 von Roche



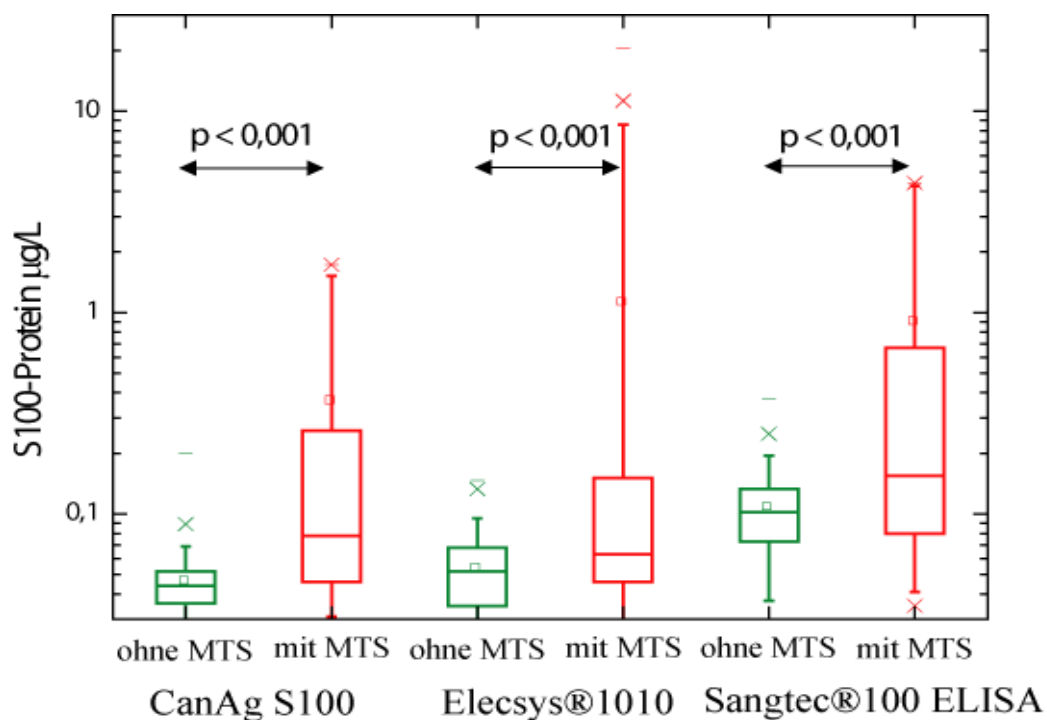
Zur Korrelationsanalyse erfolgt die Berechnung des Stichproben-Rangkorrelationskoeffizient r_s nach Spearman. Es zeigt sich ein mittlerer monotoner Zusammenhang für die Werte von DiaSorin und Dako mit $r_s=0,522$ bzw. DiaSorin und Roche $r_s=0,626$. Für den Vergleich der Serum-S100-Konzentrationen von Roche und Dako ergibt sich ein starker monotoner Zusammenhang, $r_s=0,727$. Die Ergebnisse sind statistisch signifikant.

5.2. Untersuchung der Validität der Testverfahren mithilfe des WMW-Tests

5.2.1. Vergleich der S100-Werte von Patienten mit und ohne Metastasierung

Um die Validität der verwendeten Messverfahren beurteilen zu können, erfolgt der Vergleich der gemessenen S100-Werte von metastasierten und nicht-metastasierten Patienten (Abb. 8, Tab. 10). Für alle drei Verfahren lässt sich ein signifikanter Unterschied zwischen den untersuchten Patientenkollektiven beobachten, mit deutlich höheren Konzentrationen des Tumormarkers im Serum von Patienten mit fortgeschrittener Erkrankung ($p<0,001$).

Abb. 8: Boxplots zur Darstellung des Vergleichs der S100-Konzentrationen von Patienten mit und ohne Metastasierung



Tab. 10: Ergebnisse des WMW-Tests zum Vergleich der Werte von Patienten mit und ohne MTS

	DiaSorin	Roche	Dako
Anzahl Patienten ohne MTS	254	254	96
Anzahl Patienten mit MTS	56	56	21
Mittlerer Rang Patienten ohne MTS	144,14	146,69	53,70
Mittlerer Rang Patienten mit MTS	207,04	195,47	83,21
Rangsumme Patienten ohne MTS	36610,50	37258,50	5155,50
Rangsumme Patienten mit MTS	11594,50	10946,50	1747,50
Z	-4,755	-3,550	-3,687
Exakte Signifikanz (2-seitig)	0,000	0,000	0,000

5.2.2. Untersuchung auf statistisch signifikante Unterschiede der S100-Werte in Abhängigkeit vom Tumorstadium (AJCC 2002)

Bei Patienten im Stadium I und II konnte bei keinem der drei Verfahren ein statistisch nachweisbarer Unterschied der S100-Konzentrationen festgestellt werden (Tab. 11). Die p-Werte liegen deutlich oberhalb des Signifikanzniveaus von $p < 0,05$. Ähnliche Ergebnisse ergaben sich beim Vergleich der S100-Konzentrationen im Stadium I und III, sowie II und III (Tab. 12 und 13).

Tab. 11: Ergebnisse des WMW-Tests zum Vergleich der Werte von Patienten im Stadium I und II

	DiaSorin	Roche	Dako
Anzahl Patienten Stadium I	109	109	43
Anzahl Patienten Stadium II	90	90	33
Mittlerer Rang Patienten Stadium I	94,96	94,80	37,06
Mittlerer Rang Patienten Stadium II	106,11	106,29	40,38
Rangsumme Patienten Stadium I	10350,50	10333,50	1593,50
Rangsumme Patienten Stadium II	9549,50	9566,50	1332,50
Z	-1,359	-1,401	-0,650
Exakte Signifikanz (2-seitig)	0,175	0,162	0,519

Tab. 12: Ergebnisse des WMW-Tests zum Vergleich der Werte von Patienten im Stadium I und III

	DiaSorin	Roche	Dako
Anzahl Patienten Stadium I	109	109	43
Anzahl Patienten Stadium III	53	53	18
Mittlerer Rang Patienten Stadium I	79,70	77,20	28,43
Mittlerer Rang Patienten Stadium III	85,20	90,35	37,14
Rangsumme Patienten Stadium I	8687,50	8414,50	1222,50
Rangsumme Patienten Stadium III	4515,50	4788,50	668,50
Z	-0,700	-1,675	-1,750
Exakte Signifikanz (2-seitig)	0,486	0,094	0,081

Tab. 13: Ergebnisse des WMW-Tests zum Vergleich der Werte von Patienten im Stadium II und III

	DiaSorin	Roche	Dako
Anzahl Patienten Stadium II	90	90	33
Anzahl Patienten Stadium III	53	53	18
Mittlerer Rang Patienten Stadium II	72,79	70,66	24,17
Mittlerer Rang Patienten Stadium III	70,66	74,27	29,36
Rangsumme Patienten Stadium II	6551,00	6359,50	797,50
Rangsumme Patienten Stadium III	3745,00	3936,50	582,50
Z	-0,297	-0,504	-1,193
Exakte Signifikanz (2-seitig)	0,768	0,616	0,237

Im Stadium IV konnte im Vergleich zum Stadium I bei allen drei Verfahren signifikant höhere S100-Konzentrationen im Blut festgestellt werden, $p < 0,05$ (Tab. 14). Dabei wurde nicht unterschieden zwischen Patienten, die aktuell im Stadium IV nachweisbare, überwiegend inoperable, Fernmetastasen aufweisen und Patienten, die durch Resektion der lokalisierten Fernmetastase aktuell trotz fortgeschrittenem Krankheitsstadium tumorfrei sind.

Tab. 14: Ergebnisse des WMW-Tests zum Vergleich der Werte von Patienten im Stadium I und IV

	DiaSorin	Roche	Dako
Anzahl Patienten Stadium I	109	109	43
Anzahl Patienten Stadium IV	46	46	20
Mittlerer Rang Patienten Stadium I	66,61	67,39	28,52
Mittlerer Rang Patienten Stadium IV	104,98	103,14	39,48
Rangsumme Patienten Stadium I	7261,00	7345,50	1226,50
Rangsumme Patienten Stadium IV	4829,00	4744,50	789,50
Z	-4,861	-4,530	-2,209
Exakte Signifikanz (2-seitig)	0,000	0,000	0,027

Vergleicht man die gemessenen S100-Konzentrationen im Stadium II und IV, konnten nur bei DiaSorin und Roche signifikant höhere Werte im Stadium IV beobachtet werden ($p < 0,001$). Mit $p = 0,120$ konnte dies nicht für den Test von Dako gezeigt werden, unter Verwendung des empfohlenen Cut-offs (Tab. 15). Bei der Analyse der Daten von Roche und DiaSorin konnten 136 Patientenproben einbezogen werden. Beim Vergleich der S100-Konzentrationen der Stadien II und IV gemessen mit dem EIA von Dako, konnten nur 53 Fälle einbezogen werden. Die Ergebnisse des Vergleichs der Werte im Stadium III und IV zeigen ebenfalls signifikante Unterschiede für DiaSorin und Roche, jedoch nicht für die ermittelten Werte von Dako. Der berechnete p-Wert liegt deutlich oberhalb des Signifikanzniveaus von $p < 0,05$ (Tab. 16). Auch hier zeigten sich deutliche Unterschiede in den einbezogenen Fallzahlen.

Tab. 15: Ergebnisse des WMW-Tests zum Vergleich der Werte von Patienten im Stadium II und IV

	DiaSorin	Roche	Dako
Anzahl Patienten Stadium II	90	90	33
Anzahl Patienten Stadium IV	46	46	20
Mittlerer Rang Patienten Stadium II	58,94	60,09	24,42
Mittlerer Rang Patienten Stadium IV	87,21	84,95	31,25
Rangsumme Patienten Stadium II	5304,50	5408,50	806,00
Rangsumme Patienten Stadium IV	4011,50	3907,50	625,00
Z	-3,959	-3,408	-1,561
Exakte Signifikanz (2-seitig)	0,000	0,000	0,120

Tab. 16: Ergebnisse des WMW-Tests zum Vergleich der Werte von Patienten im Stadium III und IV

	DiaSorin	Roche	Dako
Anzahl Patienten Stadium III	53	53	18
Anzahl Patienten Stadium IV	46	46	20
Mittlerer Rang Patienten Stadium III	40,08	42,25	17,67
Mittlerer Rang Patienten Stadium IV	61,42	58,92	21,15
Rangsumme Patienten Stadium III	2124,50	2239,50	318,00
Rangsumme Patienten Stadium IV	2825,50	2710,50	423,00
Z	-3,687	-2,880	-0,965
Exakte Signifikanz (2-seitig)	0,000	0,004	0,342

5.2.3. Vergleich der S100-Werte in Abhängigkeit von Tumorstadium und Metastasierung

Für die Stadien III (regionäre Haut- und Lymphknotenmetastasen) und IV (Fernmetastasen) wurde weiterhin geprüft, ob signifikante Unterschiede zwischen den S100-Werten von Patienten mit aktuell nachweisbarer Tumormasse und Patienten in Remission vorhanden sind. Für Patienten des Stadiums III konnten nur bei Verwendung des EIAs von Dako signifikante Unterschiede der S100-Konzentrationen festgestellt werden (Tab. 17).

Tab. 17: Ergebnisse des WMW-Tests zum Vergleich der Werte von Patienten im Stadium III mit und ohne MTS

	DiaSorin	Roche	Dako
Anzahl Patienten ohne MTS	29	29	10
Anzahl Patienten mit MTS	24	24	8
Mittlerer Rang Patienten ohne MTS	26,26	27,02	6,80
Mittlerer Rang Patienten mit MTS	27,90	26,98	12,88
Rangsumme Patienten ohne MTS	761,50	783,50	68,00
Rangsumme Patienten mit MTS	669,50	647,50	103,00
Z	-0,384	-0,009	-2,404
Exakte Signifikanz (2-seitig)	0,706	0,996	0,015

Im Gegensatz dazu beobachtete man beim Vergleich der S100-Werte im Stadium IV nur bei DiaSorin und Roche signifikant unterschiedliche Konzentrationen, $p < 0,05$ (Abb. 10, Abb. 11). Bei der Analyse der Serumproben mit dem Verfahren von Dako liegt der p-Wert knapp oberhalb des Signifikanzniveaus, $p = 0,074$ (Tab. 18, Abb. 9) und deutet damit jedoch einen Trend zu höheren Werten bei Patienten mit vorhandener Metastasierung an.

Tab. 18: Ergebnisse des WMW-Tests zum Vergleich der Werte von Patienten im Stadium IV mit und ohne MTS

	DiaSorin	Roche	Dako
Anzahl Patienten ohne MTS	15	15	7
Anzahl Patienten mit MTS	31	31	13
Mittlerer Rang Patienten ohne MTS	13,47	16,70	7,29
Mittlerer Rang Patienten mit MTS	28,35	28,35	12,23
Rangsumme Patienten ohne MTS	202,00	250,50	51,00
Rangsumme Patienten mit MTS	879,00	830,50	159,00
Z	-3,528	-2,391	-1,784
Exakte Signifikanz (2-seitig)	0,000	0,017	0,074

Abb. 9: Grafische Darstellung der ermittelten S100-Konzentrationen mithilfe des CanAg S100 von Dako

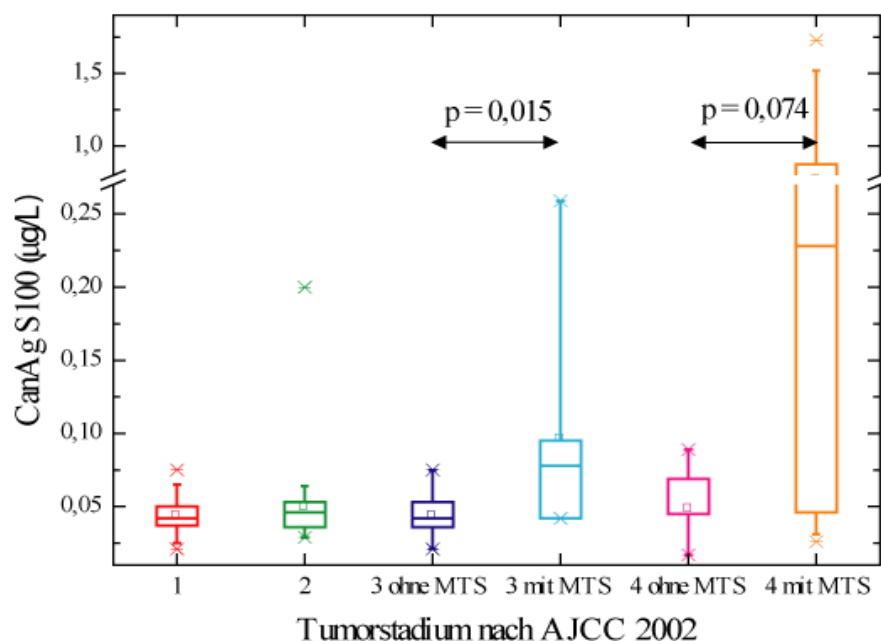


Abb. 10: Grafische Darstellung der ermittelten S100-Konzentrationen mithilfe des Sangtec®100

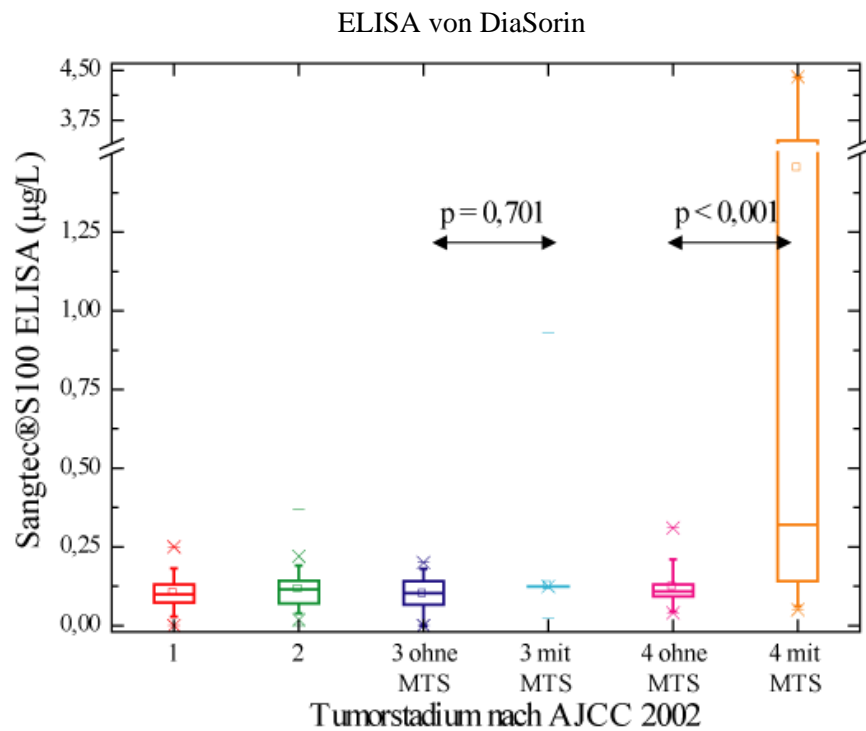
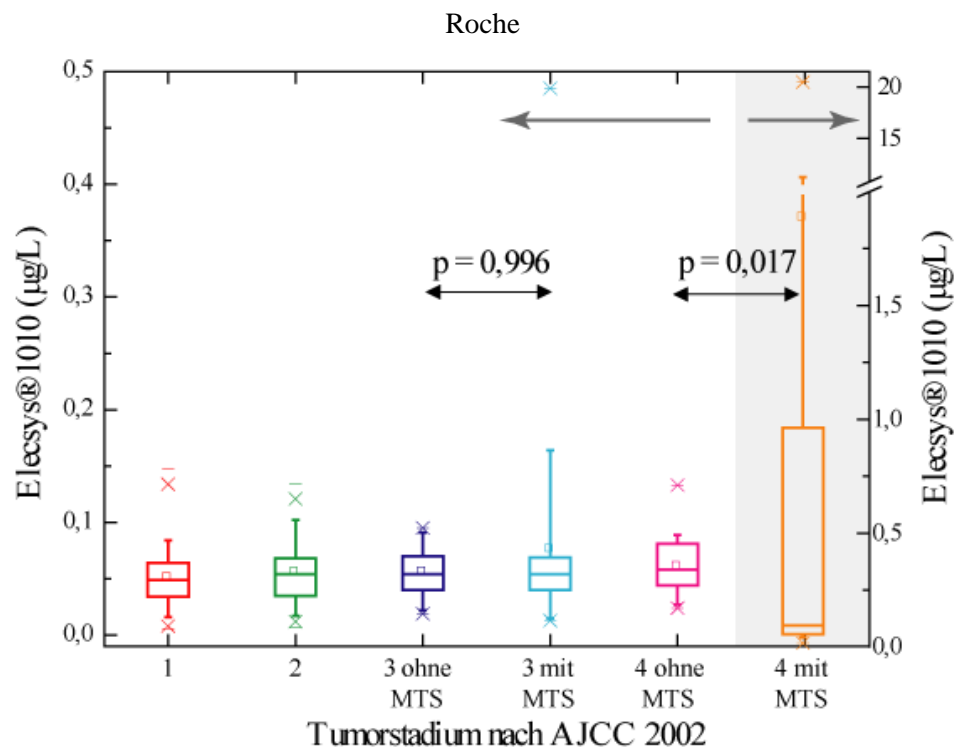


Abb. 11: Grafische Darstellung der ermittelten S100-Konzentrationen mithilfe des Elecsys®1010 von



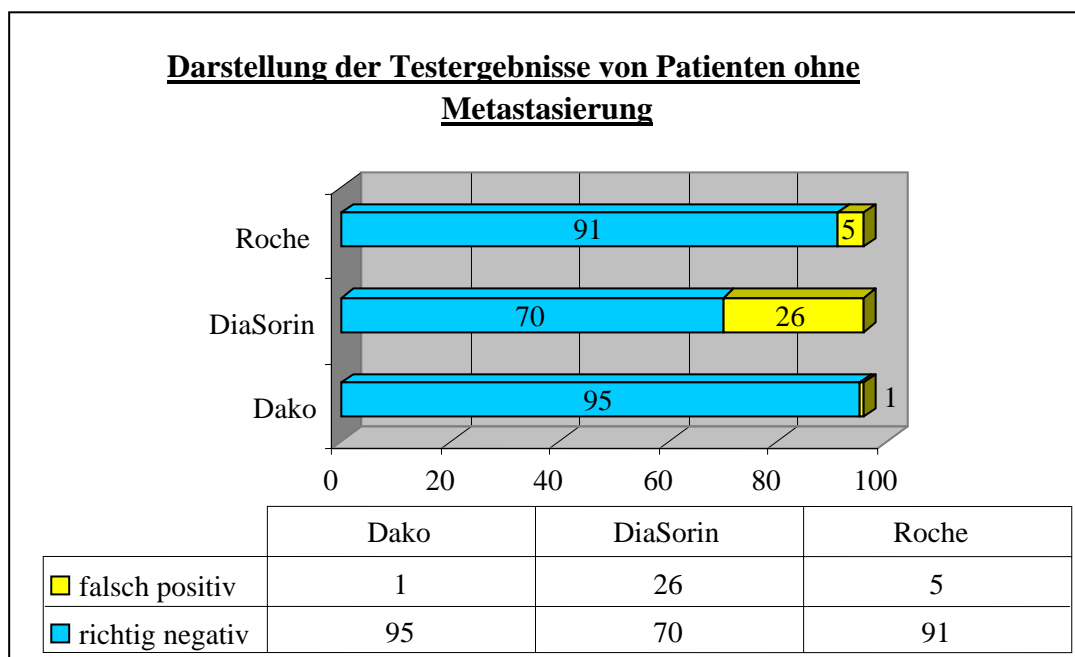
5.3. Statistische Untersuchungen zum Vergleich der Methoden von Dako, DiaSorin und Roche

5.3.1. Vergleich der Testergebnisse mithilfe des Cochran-Tests

Mithilfe des Cochran-Tests ist ein Vergleich von abhängigen Stichproben mit mehreren beobachteten binären Merkmalen möglich. Patienten mit und ohne Metastasen werden getrennt voneinander betrachtet. Dabei werden die Untersuchungsmethoden auf signifikante Testunterschiede (positives bzw. negatives Ergebnis) analysiert. Einbezogen sind nur die Patienten, deren Blutserum mit allen drei Verfahren parallel untersucht wurde (n=117).

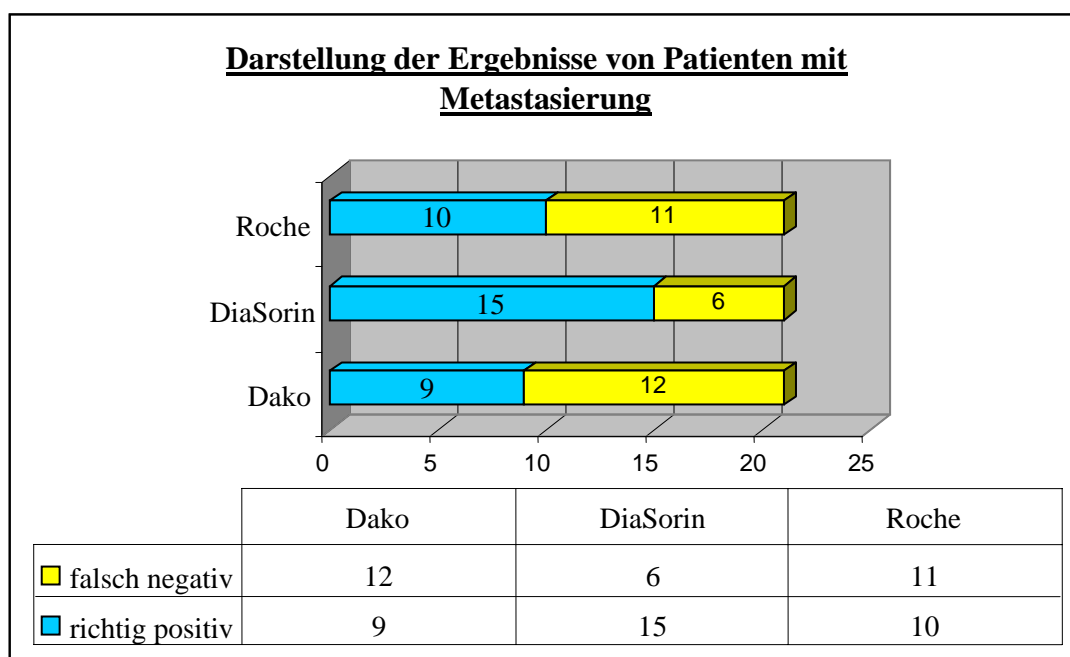
Abbildung 12 zeigt die mit den verschiedenen Methoden bestimmten Testergebnisse. Mit dem ELISA von DiaSorin sind mit 26 von 96 Testergebnissen am häufigsten falsch positive Werte gemessen worden. Bei der Analyse mit dem EIA von Dako wurde nur ein falsch positiver Wert ermittelt. Die Unterschiede der Testergebnisse sind signifikant, $p < 0,001$ (Tab. 19).

Abb. 12: Darstellung der Testergebnisse von Patienten ohne aktuell vorhandene Metastasierung (n=96)



Betrachtet man die Patienten mit Metastasen, dann zeigte sich für DiaSorin in 15 von 21 Fällen ein richtig positives Testergebnis, für Roche in 10 von 21 Fällen und Dako in 9 von 21 Fällen (Abb. 13). Auch diese Abweichung der Resultate ist signifikant, $p = 0,008$ (Tab. 19).

Abb. 13: Darstellung der Testergebnisse von Patienten mit aktuell nachweisbarer Metastasierung
(n=21)



Tab. 19: Cochran-Test für Patienten ohne und mit Metastasierung

	Q-Test für Patienten ohne MTS	Q-Test für Patienten mit MTS
n	96	21
Cochrans Q-Test	38,643	10,333
df	2	2
Asymptotische Signifikanz	0,000	0,008

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die drei verschiedenen Methoden statistisch nachweisbare unterschiedliche Testergebnisse aufweisen. Daher erfolgt im Anschluss der Vergleich der einzelnen Verfahren miteinander unter Verwendung des McNemar-Tests.

5.3.2. Vergleich der Testergebnisse mithilfe des McNemar-Tests

Mit dem McNemar-Test werden jeweils zwei abhängige Stichproben, die nur in einem binären Merkmal voneinander abweichen, auf signifikante Testunterschiede untersucht. Die Ergebnisse werden ebenfalls für Patienten mit und ohne Metastasierung getrennt betrachtet. Entscheidend für die Statistik sind die Messungen, bei denen Abweichungen des Testergebnisses zwischen zwei Methoden festgestellt wurden, d. h. Test A positiv, Test B negativ. Ausschlaggebend für die Testentscheidung ist der jeweils festgelegte Cut-off. Für den Vergleich des EIA von Dako werden stets nur die 117 Patienten mit allen drei Parallelmessungen einbezogen.

Beim Vergleich der Testergebnisse von DiaSorin und Dako lassen sich folgende Häufigkeiten bei der Messung der S100-Konzentration im Blut von Patienten ohne aktuell nachweisbare Metastasierung beobachten (Tab. 20).

Tab. 20: Häufigkeiten der ermittelten Testergebnisse nicht-metastasierter Patienten beim Vergleich von DiaSorin und Dako (n=96)

		Dako	
		Test positiv	Test negativ
DiaSorin	Test positiv	0	26
	Test negativ	1	69

Bei 69 Patienten wurde mit beiden Verfahren ein richtig negatives Testresultat ermittelt. In 27 Fällen weichen die Ergebnisse voneinander ab. Mit dem Verfahren von DiaSorin werden häufiger falsch positive Ergebnisse ermittelt. Die Unterschiede sind signifikant, $p < 0,001$ (Tab. 23).

Beim Vergleich des ELISA von DiaSorin mit dem ECLIA Roche werden bei 211 Patienten gleiche Testergebnisse erzielt. Bei 41 Patienten lag die S100-Konzentration bei DiaSorin über dem festgelegten Cut-off, im Gegensatz zu richtig negativen Befunden mit der Methode von Roche (Tab. 21). Auch diese Unterschiede sind signifikant, $p < 0,001$.

Tab. 21: Häufigkeiten der ermittelten Testergebnisse nicht-metastasierter Patienten beim Vergleich von DiaSorin und Roche (n=254)

		Roche	
		Test positiv	Test negativ
DiaSorin	Test positiv	6	41
	Test negativ	2	205

Beim Vergleich von Roche und Dako zeigte sich bei 90 von 96 Patienten ohne Metastasen ein übereinstimmendes negatives Ergebnis. In 6 Fällen fallen die Testentscheidungen unterschiedlich aus. Bei Roche wurde häufiger ein falsch positives Testergebnis beobachtet. Die ermittelten Testergebnisse weichen jedoch nicht signifikant voneinander ab, $p = 0,219$.

Tab. 22: Häufigkeiten der ermittelten Testergebnisse nicht-metastasierter Patienten beim Vergleich von Dako und Roche (n=96)

		Roche	
		Test positiv	Test negativ
Dako	Test positiv	0	1
	Test negativ	5	90

Tab. 23: Statistische Auswertung des McNemar-Tests für Patienten ohne Metastasierung

	Vergleich Dako & DiaSorin	Vergleich Dako & Roche	Vergleich DiaSorin & Roche
n	96	96	254
Exakte Signifikanz (2-seitig)	0,000	0,219(a)	0,000
Exakte Signifikanz (1-seitig)	0,000	0,109	0,000

a Verwendete Binomialverteilung

Betrachtet man die Testergebnisse von Patienten mit aktuell nachweisbarer Metastasierung ergeben sich ähnliche Ergebnisse. In 6 von 21 Fällen werden beim Vergleich von DiaSorin und Dako unterschiedliche Testresultate ermittelt (Tab. 24). Mit dem EIA von Dako wurden häufiger falsch negative Ergebnisse ermittelt. Mithilfe des McNemar-Test wird die Signifikanz der unterschiedlichen Ergebnisse bestätigt, $p=0,031$ (Tab. 27)

Tab. 24: Häufigkeiten der ermittelten Testergebnisse metastasierter Patienten beim Vergleich von DiaSorin und Dako (n=21)

		Dako	
		Test positiv	Test negativ
DiaSorin	Test positiv	9	6
	Test negativ	0	6

Beim Vergleich von DiaSorin und Roche fiel die Testentscheidung bei 13 Patienten unterschiedlich aus. In 12 Fällen lag der Wert des S100-Proteins bei DiaSorin über dem Cut-off, während der Wert bei Roche im Referenzbereich lag (Tab. 25). Auch diese Unterschiede sind statistisch signifikant, $p=0,03$.

Tab. 25: Häufigkeiten der ermittelten Testergebnisse metastasierter Patienten beim Vergleich von DiaSorin und Roche (n=56)

		Roche	
		Test positiv	Test negativ
DiaSorin	Test positiv	17	12
	Test negativ	1	26

Beim Vergleich von Roche und Dako (Tab. 26) zeigte sich bei 20 der 21 Patienten mit Metastasen ein gleiches Testresultat. Statistisch signifikante Unterschiede für diese beiden Verfahren waren damit nicht nachweisbar, $p=1$.

Tab. 26: Häufigkeiten der ermittelten Testergebnisse metastasierter Patienten beim Vergleich von
Dako und Roche (n=21)

		Roche	
		Test positiv	Test negativ
Dako	Test positiv	9	0
	Test negativ	1	11

Tab. 27: Statistische Auswertung des McNemar-Tests für Patienten mit Metastasierung

	Vergleich Dako & DiaSorin	Vergleich Dako & Roche	Vergleich DiaSorin & Roche
n	21	21	56
Exakte Signifikanz (2-seitig)	0,031(a)	1,000(a)	0,003(a)
Exakte Signifikanz (1-seitig)	0,016	0,500	0,002

a Verwendete Binomialverteilung

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass der ELISA von DiaSorin als einzige Methode eine statistisch nachweisbare Abweichung von den jeweils beiden anderen Verfahren zeigt. Mit dem Verfahren von DiaSorin wurden deutlich häufiger Werte oberhalb des Cut-offs ermittelt. Dabei wurden sowohl vermehrt richtig positive als auch falsch positive Werte erhoben.

5.3.3. Berechnung von Sensitivität und Spezifität sowie der Vorhersagewerte

Zur Umwandlung der metrischen Daten in binäre, erfolgt die Einteilung mithilfe des jeweiligen Cut-offs in Test-positive (oberhalb des Cut-offs) und Test-negative Ergebnisse (im Referenzbereich). Für den ELISA von DiaSorin liegt der Cut-Off nach Herstellerangaben bei 0,15µg/L, für den ECLIA von Roche bei 0,105µg/L und für den EIA von Dako bei 0,091µg/L. Ausgehend von den beobachteten Häufigkeiten, dargestellt anhand von Kreuztabellen (Tab. 28-30), ließen sich die Werte für Sensitivität, Spezifität sowie die Vorhersagewerte berechnen.

Tab. 28: Darstellung der Ergebnisse des ELISA von DiaSorin als Kreuztabelle

	DiaSorin		Summe
	Test positiv	Test negativ	
MTS	29	27	56
Keine MTS	47	207	254
Summe	76	234	310

Tab. 29: Darstellung der Ergebnisse des ECLIA von Roche als Kreuztabelle

	Roche		Summe
	Test positiv	Test negativ	
MTS	18	38	56
Keine MTS	8	246	254
Summe	26	284	310

Tab. 30: Darstellung der Ergebnisse des EIA von Dako als Kreuztabelle

	Dako		Summe
	Test positiv	Test negativ	
MTS	9	12	21
Keine MTS	1	95	96
Summe	10	107	117

Die höchste Sensitivität mit 52% ließ sich für das Verfahren von DiaSorin bestimmen. Das Verfahren von Dako besitzt eine Sensitivität von 43%, die Methode von Roche 32%. Vergleicht man die Spezifitäten ergibt sich der höchste Wert von 99% für Dako, 97% für Roche und 82% für DiaSorin. Damit ist der ELISA von DiaSorin, der Test mit der höchsten Sensitivität und niedrigsten Spezifität.

Die Vorhersagewerte wurden ebenfalls berechnet. Bei einem positiven Testergebnis einer Messung mit dem Sangtec®100 ELISA muss in 38% der Fälle von einer tatsächlich vorhandenen Metastasierung ausgegangen werden, bei dem Elecsys®1010 in 69%, bei CanAg S100 in 90% der Fälle. Für den ELISA ergibt sich also der höchste Anteil falsch positiver Werte, für den EIA der geringste Anteil. Bei der Bestimmung des negativen Vorhersagewertes ergibt sich für den ELISA in 88% der Fälle ein richtig negatives Ergebnis, für den ECLIA in 87%, für den EIA in 89%.

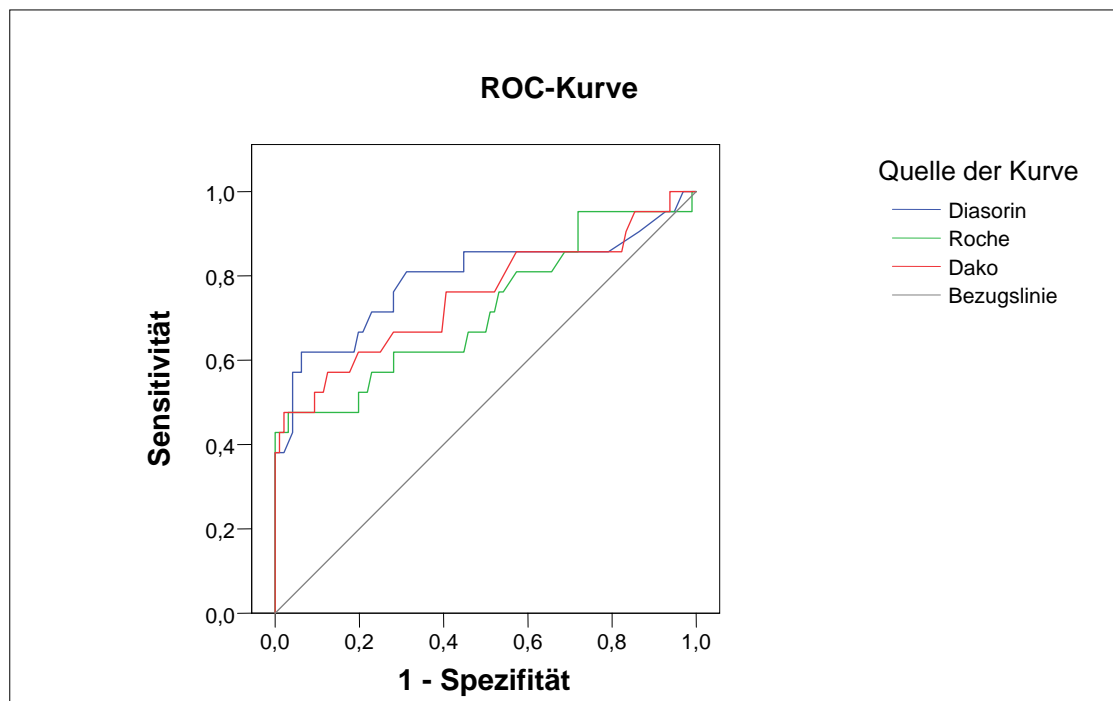
Untersucht man nur die Ergebnisse der Patienten im Stadium III (lokoregionäre Metastasierung), so werden mit dem ELISA von DiaSorin 7 von 24 Patienten (29%) als richtig positiv erkannt. Mit dem EIA von Dako sind 25% (2/8) und mit dem ECLIA von Roche nur 13% (3/24) der Testergebnisse positiv.

Betrachtet man die Sensitivität der Testverfahren nur für Patienten im Stadium IV findet man bei DiaSorin in 21 von 31 Fällen (68%) ein richtig positives Ergebnis, bei Roche in 15 von 31 Fällen (48%) bzw. Dako in 7 von 13 Fällen (54%). Die Spezifitäten betragen entsprechend 80% (12/15 Fällen), 93% (14/15 Fällen) bzw. 100% (7/7 Fällen). Für den positiven Vorhersagewert wurde für DiaSorin in 88% (21/24 Fällen), Roche in 94% (15/16 Fällen) und Dako in 100% (7/7 Fällen) ein richtig positives Ergebnis von allen positiven Ergebnissen beobachtet. Die negativen Vorhersagewerte liegen bei 55% (12/22 Fällen) bei DiaSorin, 47% (14/30 Fällen) bei Roche und 54% (7/13 Fällen) bei Dako.

5.3.4. Bestimmung der ROC-Kurven

Um die Verfahren auf ihre Güte unabhängig vom angewendeten Cut-off zu vergleichen, erfolgt die Berechnung von ROC-Kurven (Abb. 14) und der Fläche unter den Kurven.

Abb. 14: Darstellung der ROC-Kurve für den Methodenvergleich zur Bestimmung des S100-Proteins



Für alle drei Messmethoden lässt sich ein signifikanter Informationsgewinn im Gegensatz zur Zufallszuteilung, deren Kurve die Bezugslinie darstellt, beobachten. Der p-Wert liegt für alle drei Verfahren deutlich unterhalb des Signifikanzniveaus von $p < 0,05$. Für den ELISA von DiaSorin ist die Fläche unter der Kurve mit 79,3% der Gesamtfläche am größten (Tab. 31). Damit stellt dieses Verfahren, die Methode mit dem höchsten Informationsgewinn dar. Das Verfahren von Dako folgt mit 75,2%, der ECLIA von Roche mit 72% der Gesamtfläche. Die Konfidenzintervalle der berechneten Flächen unter den Kurven überschneiden sich jedoch.

Tab. 31: Berechnung der Fläche unter der Kurve für den Vergleich von Dako, DiaSorin und Roche

Variable(n) für Testergebnis	Fläche	Standard- fehler(a)	Asymptotische Signifikanz(b)	Asymptotisches 95% Konfidenzintervall	
				Untergrenze	Obergrenze
Dako	0,752	0,070	0,000	0,615	0,890
DiaSorin	0,793	0,068	0,000	0,659	0,928
Roche	0,720	0,071	0,002	0,582	0,859

a Unter der nichtparametrischen Annahme

b Nullhypothese: Wahrheitsfläche = 0.5

6. Diskussion

Nach den aktuellen Zahlen der Deutschen Krebshilfe und der Arbeitsgemeinschaft Dermatologische Prävention erkranken jährlich 22000 Menschen am gefährlichsten Tumor der Haut, dem malignen Melanom. Etwa 2300 Menschen sterben jährlich daran (www.krebshilfe.de). Die Inzidenz des Melanoms hat sich in den letzten drei Jahrzehnten verdreifacht. Insbesondere Tumore mit einer Dicke $<2\text{mm}$ wurden häufiger diagnostiziert. Die Mortalität liegt nach den aktuellen Zahlen bei 2,8Fällen/100000EW pro Jahr und ist damit im Vergleich zur Mortalität vor 30 Jahren mit 1,5-2,6Fällen/100000EW pro Jahr beobachtet in Baden-Württemberg etwa konstant geblieben (Lasithiotakis et al. 2006). Prinzipiell tritt das Melanom in jedem Lebensalter auf. Das mediane Erkrankungsalter liegt jedoch zwischen dem 50. und 60. Lebensjahr mit steigender Tendenz. Selten sind Patienten jünger als 20 Jahre (1% der Fälle). Weiterhin ließ sich beobachten, dass bei Patienten >70 Jahre die Tumordicke des Primärtumors signifikant größer ist, als bei jüngeren Patienten.

Aufgrund der steigenden Anzahl von Patienten mit malignen Melanomen ist es notwendig effiziente Nachsorgekonzepte zu entwickeln, um die Mortalität weiter auf dem derzeitigen Niveau zu halten bzw. zu senken. International bestehen keine einheitlichen Leitlinien für die stadienabhängige Durchführung der Nachsorge. Insbesondere die Anwendung apparativer Techniken wird kontrovers diskutiert (Garbe et Schadendorf 2003).

In einer prospektiven Studie von Garbe et al. (2003) wurden bei 2008 Patienten im Stadium I bis IV stadienabhängige Nachsorgeuntersuchungen laut den deutschen Leitlinien durchgeführt. Über einen Zeitraum von 25 Monaten wurden die verschiedenen Untersuchungstechniken zur Erkennung eines Rezidivs, eines Zweitmelanoms bzw. der Metastasierung des Tumors evaluiert. In 17% der Fälle wurde der Progress der Erkrankung durch den Patienten selbst festgestellt. Mehr als 70% der Fälle wurden im Rahmen der konsequenten Nachsorgeuntersuchungen diagnostiziert. In 50% der Fälle führte die klinische Untersuchung zur Diagnose eines Progresses der Erkrankung. Die Sonografie der Lymphknoten stellt das Verfahren mit der höchsten Sensitivität zur frühzeitigen Entdeckung von Metastasen dar. Hierbei handelt es sich hauptsächlich um In-transit- oder Satellitenmetastasen sowie regionale Lymphknotenmetastasen. Nur 0,6% aller durchgeführten Röntgen-Thorax Untersuchungen gaben Hinweise auf verdächtige Läsionen und werden daher nur im Stadium III und IV als sinnvoll erachtet. Ähnliche Ergebnisse zeigten sich bei der Auswertung der Befunde der Sonografie des Abdomens. Die Computertomografie zeichnete sich als das Verfahren mit dem größten Vorteil zur Diagnostik von suspekten

Befunden und der Ausbreitungsdiagnostik einer fortgeschrittener Erkrankung (Stadium III und IV) aus. Die Bestimmung von LDH zeigte bei Patienten mit Metastasierung signifikant erhöhte Werte. Aufgrund der geringen Sensitivität trug die Bestimmung nur in wenigen Fällen zur Diagnose des Progress der Erkrankung bei. Das S100-Protein war in etwa 50% der Fälle von Patienten die eine Fernmetastasierung entwickelten, erhöht. Dabei waren bei einem Viertel der Fälle erhöhte Konzentrationen des Proteins der erste Hinweis für eine Metastasierung und zogen aufwändigere apparative Methoden zur Ausbreitungsdiagnostik nach sich. Die Bestimmung des S100 β wird ab dem Stadium I bei einer Tumordicke von über 1mm empfohlen. Neben der Laktatdehydrogenase, welche bei ausgeprägter Metastasierung im Stadium III und IV prognostische Aussagen ermöglicht, ist das S100-Protein bisher als einziger Tumormarker zur Routinediagnostik im Rahmen der Nachsorge empfohlen. Kontrollierte, randomisierte Studien zum Vergleich verschiedener Nachsorgekonzepte stehen bisher aus. Aussagen über den Einfluss verschiedener Nachsorgestrategien auf das Gesamtüberleben sind daher bisher nicht möglich. Festzustellen ist jedoch, dass der Nachweis von Metastasen im frühen Stadium mit der Möglichkeit einer chirurgischen Sanierung, mit einer signifikant besseren Gesamtüberlebenszeit einhergeht. Es ist jedoch kritisch zu betrachten, ob es sich dabei wirklich um eine verlängerte Überlebenszeit oder nur um eine frühzeitigere Diagnose handelt.

Das S100-Protein wurde 1988 von Fagnart et al. erstmals im Serum von metastasierten Melanom-Patienten nachgewiesen. In nachfolgenden Studien wurde mehrfach gezeigt, dass das S100-Protein von prognostischer Relevanz ist und erhöhte Werte mit vermindertem Gesamtüberleben assoziiert sind (Schoultz et al. 1996, Bonfrer et al. 1998, Hauschild et al. 1999a). Auch zur Therapieevaluation liegen Studien vor, welche den Nutzen von S100 als Verlaufsparemeter beobachteten (Hauschild et al. 1999b, Henze et al. 1997).

Neben dem S100-Protein gibt es eine Reihe von Tumormarkern, welche in Verbindung mit malignen Melanomen auf ihre Verwendung bei der Nachsorge von Tumorpateinten untersucht wurden. Verschiedene Studien haben gezeigt, dass MIA im Vergleich zum S100-Protein eine vergleichbare bzw. sogar bessere Sensitivität und Spezifität erreicht (Djukanovic et al. 2000, Schmitz et al. 2000, Juergensen et al. 2001, Tas et al. 2004). Loppin et al. (2007) konnten diese Ergebnisse in einer prospektiven Studie mit jedoch nur 50 untersuchten Patienten nicht bestätigen. Nach der aktuellen Studienlage scheint MIA neben dem S100-Protein der vielversprechendste Marker bei der klinischen Anwendung in der Nachsorge von Melanom-Patienten zu sein.

Deichmann et al. (1999) zeigten, dass LDH signifikant erhöht ist bei metastasierten Patienten mit Stadium III/IV und mit einem verkürzten Gesamtüberleben assoziiert ist. Auffällig war, dass durch die Bestimmung von S100 und MIA keine zusätzlichen signifikanten Informationen für die Prognose der Patienten erbracht werden konnte. Diese Ergebnisse werden von einer Studie von Bánfalvi et al. (2002) gestützt. Die Autoren wiesen allerdings daraufhin, dass zwischen LDH, S100 und MIA eine sehr enge Korrelation der Werte besteht, was den fehlenden Informationszuwachs erklären könnte. Kritisch ist die geringe Spezifität des Markers zu betrachten, welche bei der Interpretation von erhöhten Werten beachtet werden muss.

Weiterhin hat sich die Bestimmung von S100-Protein mittels immunoluminometrischen Tests im Gegensatz zur Bestimmung von Tyrosinase mittels PCR als eindeutig sensitiver erwiesen (Berking et al. 1999, Garbe et al. 2003). Schittek et al. (1999) zeigten, dass durch die zusätzliche Bestimmung von Melan A neben Tyrosinase, die Sensitivität des Verfahrens deutlich gesteigert werden konnte. Aufgrund individueller Expressionsmuster scheint die Multi-Marker-PCR Vorteile zu bringen. Multizentrische, prospektive Studien an großen Patientenkollektiven stehen jedoch noch aus. Zusätzlich ist die einfachere Anwendung von kommerziellen Test-Kits zur Bestimmung des S100-Proteins ein weiterer Vorteil gegenüber der PCR-Technik.

Bis Mitte der 90er Jahre erfolgte die Bestimmung des S100-Proteins in den veröffentlichten Studien mit einem radioimmunometrischen Test (Sangtec®100 IRMA, Byk-Sangtec Diagnostica, Dietzenbach, Deutschland). Durch die Entwicklung eines neuen immunoluminometrischen Assays (Sangtec®100 Lia-mat) konnte die Sensitivität des Tests deutlich gesteigert werden. Durch ein verbessertes Markierungsprinzip wurde die Messung von S100-Konzentrationen ab einem Level von $0,02\mu\text{g/L}$ möglich (Stigbrand et al. 2000). In der Studie von Krähn et al. (1998) wurden 273 Serumproben mit beiden Verfahren untersucht. Die Sensitivität des immunoradiometrischen Assays (RIA) betrug 77%. Mithilfe des immunoluminometrischen Assays (LIA) konnte dieser Anteil auf 86% erhöht werden. Zusätzlich wurde bei 27 Patienten mit visceralen Metastasen der Verlauf des Parameters mit dem klinischen Verlauf korreliert. Unter Verwendung des radioimmunometrischen Assays entsprach in 74% der Fälle der Serumspiegel des S100-Proteins dem klinischen Verlauf der Erkrankung. Mit dem immunoluminometrischen Assay konnte in 89% der Fälle eine positive Korrelation beobachtet werden. Curry et al. (1999) bestätigten diese Ergebnisse und

beobachteten in ihrer Studie außerdem, dass nur für den immunoluminometrischen Test eine prognostische Signifikanz erhöhter S100-Werte beobachtet werden konnte.

In der vorliegenden Arbeit werden drei verschiedene Untersuchungsmethoden zur Bestimmung des S100-Proteins miteinander verglichen. Neben der Validität der Testverfahren, wurde außerdem die diagnostische Sensitivität und Spezifität sowie die Testgüte, unabhängig von festgelegten Grenzwerten, überprüft. Grundlegend für alle drei Verfahren ist die Detektion des Proteins im Serum von Patienten mit Hilfe monoklonaler Antikörper. Diese Immunglobuline sind gegen verschiedene Epitope des Proteins gerichtet und bilden mit dem S100-Protein einen Sandwichkomplex. Die Antikörper sind bei dem ELISA von DiaSorin und dem EIA von DakoCytomation mit dem Enzym Peroxidase gekoppelt, welches bei Vorhandensein von S100 β zu einem messbaren Farbumschlag des Reaktionsgemisches führt. Die beiden Assays gehören zu den manuellen Testverfahren. Bei dem Elektro-Chemilumineszenz-Immuno-Assay von Roche ist der S100-Antikörper an einen Rutheniumkomplex gekoppelt, welcher durch Wechsel des Anregungszustandes detektierbare Photonen abgibt. Diese werden als relative Lichteinheiten registriert. Die Messung erfolgt vollautomatisch. Der monoklonale Antikörper des Tests von Dako und der monoklonale Antikörper des Tests von Roche sind spezifisch für dieselben Epitope des S100-Proteins. Für das Verfahren von DiaSorin werden Immunglobuline anderer Spezifität verwendet.

In der vorliegenden Studie erfolgte die Korrelationsanalyse über die Bestimmung des Rangkorrelationskoeffizienten r_s nach Spearman. Der r_s variiert von 0,522 (Dako vs. DiaSorin) bis 0,727 (Dako vs. Roche). Der Korrelationskoeffizient zum Vergleich von DiaSorin vs. Roche liegt bei 0,626. Eine mittlere bis starke Korrelation der S100-Konzentrationen lässt sich damit signifikant nachweisen. Erhöhte Werte des einen Verfahrens gehen mit erhöhten Konzentrationen, gemessen mit dem jeweils anderen Verfahren, einher. Die gemessenen Korrelationskoeffizienten liegen jedoch unterhalb der in der Literatur beschriebenen Werte. Die Genauigkeit der Werte und somit die Stärke der Korrelation hängt insbesondere bei manuellen Tests direkt von der sorgfältigen Durchführung des Pipettierens, Vortexens und Aspirierens sowie von der konsequenten Einhaltung der Verfahrens- und Temperaturanforderungen ab.

In der Studie von Smit et al. 2005 zum Vergleich von Verfahren zur Bestimmung des S100-Proteins wurden für alle drei Verfahren Stichproben-Rangkorrelationskoeffizienten größer 0,9 berechnet: 0,918 (Roche vs. DiaSorin), 0,934 (DiaSorin vs. Roche), 0,959 (Dako vs. Roche).

Wie in unserer Studie korrelieren die absoluten S100-Werte, gemessen mit dem CanAg S100 EIA und dem ECLIA Elecsys®1010, am stärksten miteinander. Ausschlaggebend für diese Ergebnisse kann die Verwendung von verschiedenen Antikörpern gleicher Spezifität bei diesen beiden Verfahren sein. Zusätzlich zeigte sich, dass die manuellen Verfahren geringer miteinander korrelierten als die Messungen mit vollautomatischen Techniken. Als Ursache ist das erhöhte Risiko für Verfälschungen bei der manuellen Durchführung des Tests, z.B. durch unterschiedliche Untersucher und Pipetten, zu diskutieren.

In der Multicenter-Studie von Alber et al. (2005) zum Vergleich des Elecsys® von Roche mit dem Sangtec®100 von DiaSorin, variierten die Korrelationskoeffizienten von 0,76-0,95. Die ermittelten Konzentrationen waren damit ebenfalls deutlich stärker miteinander korrelierbar. In dieser Studie wurden die Analysen mit halbautomatischen Assays durchgeführt.

Insgesamt zeigen die einzelnen Studien eine gute Korrelation der einzelnen Verfahren. Um die Genauigkeit der einzelnen Tests in den jeweiligen Labors zu überprüfen und zu standardisieren, wäre jedoch die Einführung von Ringversuchen zur Bestimmung des S100 β empfehlenswert.

Um die Validität der Testverfahren zu prüfen, wurde untersucht, ob sich die Konzentrationen des S100-Proteins in Abhängigkeit von der vorhandenen Metastasierung und dem Stadium nach AJCC 2002 signifikant unterscheiden. Für die Konzentrationen des S100-Proteins von Patienten mit und ohne Metastasen zeigte sich ein hochsignifikanter Unterschied bei allen drei verwendeten Verfahren, $p < 0,001$. Bei der Betrachtung der S100-Werte in Abhängigkeit vom Tumorstadium ließen sich für den Sangtec®100 ELISA und dem Elecsys®1010 signifikante Unterschiede beim Vergleich der Konzentrationen im Stadium I vs. IV, II vs. IV und III vs. IV feststellen ($p < 0,001$ bzw. $p < 0,004$). Für den CanAg S100 konnte nur zwischen Stadium I und IV signifikante Unterschiede festgestellt werden, $p = 0,027$. Als Ursachen für die schlechteren Ergebnisse kann die geringere Anzahl der analysierten Proben mit (117 vs. 310) in Betracht gezogen werden. Zusätzlich ist festzustellen, dass für den CanAg S100 von Dako insgesamt deutlich niedrigere Konzentrationen als mit den anderen beiden Verfahren gemessen wurden. Weiterhin ist auffällig, dass die Standardabweichung der Werte um den Mittelwert am geringsten ist. Der Mittelwert aller gemessenen Daten mit dem EIA beträgt $0,0999\mu\text{g/L} \pm 0,2442\mu\text{g/L}$, der Maximalwert erreicht lediglich $1,728\mu\text{g/L}$. Für den Elecsy®1010 ergibt sich ein Mittelwert von $0,2379\mu\text{g/L} \pm 1,508\mu\text{g/L}$ und ein Maximalwert von $20,51\mu\text{g/L}$. Für den Sangtec®100 ELISA beträgt der Mittelwert $0,244\mu\text{g/L} \pm 0,689\mu\text{g/L}$ mit einem Maximum von $4,4\mu\text{g/L}$. Die unterschiedlichen Wertebereiche spiegeln sich

ebenfalls in der Festlegung verschiedener Cut-offs wider. Als eine Ursache für die Abweichung der absoluten S100-Konzentrationen wird das Fehlen internationaler Referenz-Standards diskutiert. So kommt es zur Verwendung unterschiedlicher Kalibratoren für die Berechnung der entsprechenden Eichkurven. Jedoch ist durch die Verwendung unterschiedlicher Analyseprinzipien die generelle Vergleichbarkeit der Werte fraglich.

Weiterhin wurde untersucht, ob innerhalb der Gruppe von Patienten im Stadium III und IV Unterschiede zwischen Patienten mit und ohne aktuell bekannte Metastasierung nachweisbar sind. Im Stadium III (lokoregionäre Metastasierung) konnte dies nur für den EIA statistisch signifikant beobachtet werden. Dieses Ergebnis ist jedoch aufgrund der geringen Fallzahl sehr kritisch zu betrachten. Als eine mögliche Ursache für diese Ergebnisse kann diskutiert werden, dass bei Patienten im Stadium III mit regionalen Lymphknotenmetastasen, die Ausbreitung der Tumors in die Blutzirkulation noch nicht erfolgt sein muss. Ist das S100 im Serum erhöht, sind jedoch weitere apparative und serologische Untersuchungen notwendig, da eine Metastasierung entweder noch nicht entdeckt wurde bzw. eine hohe Wahrscheinlichkeit einer kurzfristig nachweisbaren Metastasierung besteht. Meier et al. beobachteten über einen Zeitraum von 20 Jahren 3001 Patienten mit Fokus auf verschiedene Metastasierungswege und ihren zeitlichen Verlauf. 466 der untersuchten Patienten entwickelten Metastasen. Sie konnten zeigen, dass etwa zwei Drittel dieser Patienten nach Behandlung des Primärtumors, initial regionale Lymphknotenmetastasen sowie In-transit- oder Satellitenmetastasen entwickelten. Ein Drittel entwickelte schon initial Fernmetastasen. Dabei entwickelten sich die regionalen Metastasen durchschnittlich mit einer Latenz von 16-17 Monaten, während Fernmetastasen mit einer Latenz von 24-30 Monaten auftraten. Dabei konnten keine signifikanten Unterschiede der Latenz zur Entwicklung von Fernmetastasen bei Patienten mit initialer regionaler Metastasierung oder direkter Fernmetastasierung beobachtet werden. Die Autoren schlussfolgerten, dass also auch bei Patienten mit In-transit-, Satelliten oder regionalen Lymphknotenmetastasen eine hämatogene Metastasierung schon erfolgt sein kann. Im Stadium IV konnte signifikant für die Verfahren von Roche und Diasorin gezeigt werden, dass bei Patienten in Remission geringere Konzentrationen des S100-Proteins im Serum nachweisbar sind. Bei Dako lag der p-Wert im Stadium IV knapp oberhalb des Signifikanzniveaus und zeigte daher einen deutlichen Trend zu höheren Werten bei vorhandener Metastasierung. Insgesamt zeigte sich, dass bei Patienten im Stadium IV mit ausgedehnter Metastasierung signifikant höhere S100-Werte gemessen werden konnten, als bei Patienten mit regionalen Tumorabsiedelungen oder Patienten in Remission. Damit stimmen die vorliegenden Ergebnisse mit den Resultaten anderer Studien sehr gut überein (Wollina et al. 2000,

Hauschild et al. 1999a, Bonfrer et al. 1998, Henze et al. 1997, Abraha et al. 1997, Guo et al. 1995).

Im Stadium I und II, d.h. bei Patienten mit Primärtumor ohne bisher nachweisbare Metastasierung, treten selten erhöhte S100-Werte auf. Die Bestimmung des S100 β ist somit nicht zum generellen Screening auf maligne Melanome von asymptomatischen Personen geeignet. Die gründliche Inspektion des gesamten Integuments stellt die Methode der Wahl zur Entdeckung von malignen Melanomen dar. In der Nachsorge von Patienten mit bekanntem Melanom ist jedoch ein Anstieg des S100-Proteins als Verdacht auf eine Metastasierung des Tumors zu werten und sollte eine bildgebende Diagnostik zum Ausschluss eines Progresses der Erkrankung nach sich ziehen. Weiterhin kommt der Bestimmung des S100-Proteins bei der Therapieüberwachung Bedeutung zu. In dieser Studie konnten jedoch aufgrund des zu kurzen Beobachtungszeitraums keine Aussagen über die Zusammenhänge zwischen seriell gemessenen S100-Werten und dem Verlauf der Erkrankung bzw. Therapie getroffen werden. Aussagen über die prognostische Signifikanz der gemessenen Werte sind somit ebenfalls nicht möglich.

Die mit den drei verschiedenen Verfahren ermittelten S100-Konzentrationen wurden in Abhängigkeit eines festgelegten Cut-offs in Test-positiv und Test-negativ unterschieden. Werte oberhalb dieser definierten Konzentration werden als erhöht angesehen. Der Cut-off entspricht zumeist der 95. Perzentile der Serum-S100-Konzentration gesunder Kontrollprobanden. In der vorliegenden Arbeit wurden die vom Hersteller an gesunden Probanden ermittelten Cut-offs für die Analyse übernommen. Dieses Vorgehen ist jedoch kritisch zu betrachten, da entsprechend der vorherrschenden Bedingungen im eigenen Labor (Geräte, Pipetten, Raumluft, Personal) und den Besonderheiten des jeweiligen Patientenkollektives der Klinik in Hinblick auf Umwelteinflüsse, Ernährung, Lebensbedingungen, die Bestimmung eigener Cut-offs von den Anbietern der einzelnen Tests empfohlen wird. Für den EIA wurde von den Herstellern ein Cut-off von $>0,091\mu\text{g/L}$ festgelegt. Für den ELISA gelten Werte $\geq 0,15\mu\text{g/L}$ als erhöht. Für den ECLIA liegt der Cut-off bei $\geq 0,105\mu\text{g/L}$.

Liegt der festgelegte Cut-off bei höheren Konzentrationen, geht dies mit einer geringeren Sensitivität, jedoch erhöhten Spezifität einher. Falsch positive Werte treten seltener auf, falsch negative Testergebnisse häufiger. Im Gegenzug bewirkt ein niedriger festgelegter Cut-off eine erhöhte Anzahl der falsch positiven Testergebnisse. Die Sensitivität wird auf Kosten der Spezifität verbessert. Ziel ist es den Cut-off zu ermitteln, mit dem die größtmögliche Sensitivität und Spezifität erreicht werden kann.

Smit et al. (2005) zeigten in ihrer komparativen Studie, dass die vom Hersteller angegebenen Referenzwerte mit denen aus eigenen Messungen Gesunder ermittelten Cut-offs übereinstimmen. Lediglich für DiaSorin lag der ermittelte Cut-off bei $0,13\mu\text{g/L}$ und war damit niedriger als der empfohlene Wert. Alber et al. (2005) zeigten ebenfalls, dass bei selbst durchgeführten Cut-off-Messungen vergleichbare Werte ermittelt wurden, entsprechend den Empfehlungen der Hersteller. Bei Bonfrer et al. (1998) wurde für den immunoluminometrische Test von DiaSorin ein Cut-off von $0,16\mu\text{g/L}$ berechnet. In anderen Studien wurde wie in der vorliegenden Arbeit auf die Messung eigener Kontrollproben verzichtet und nach Testvorschrift der Cut-off gewählt (Wollina et al 1999, Kaskel et al 1999, Hauschild et al. 1999a).

Nach Einordnung der Werte in erhöhte und nicht erhöhte Tumormarkerkonzentrationen wurden die ermittelten Testergebnisse mit den aktuellen dargebotenen Befunden der Patienten verglichen. Besondere Aufmerksamkeit wurde auf die Fälle gerichtet, in denen die Testergebnisse voneinander abwichen. Dabei zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen dem ELISA von DiaSorin und dem EIA von DakoCytomation sowie zwischen dem ELISA und dem ECLIA von Roche. Insgesamt beobachtete man für den Sangtec®100 ELISA häufiger Konzentrationen des S100-Proteins oberhalb des Cut-offs als für die anderen beiden Verfahren. Dabei war der Anteil der richtig positiven Ergebnisse ebenso erhöht wie der Anteil der falsch positiven Werte. Beim Vergleich des EIA mit dem ECLIA zeigten sich keine statistisch fassbaren Unterschiede der Testentscheidungen. Diese Ergebnisse spiegeln sich auch in der Bestimmung der Sensitivität und Spezifität deutlich wider, deren Werte ebenfalls direkt vom verwendeten Cut-off abhängen. Für den Sangtec®100 wurde für alle Patienten mit 52% die höchste Sensitivität (Anteil richtig positiver Testergebnisse bei Patienten mit aktueller Metastasierung) ermittelt. Das Verfahren von Dako erreicht in der vorliegenden Analyse eine Sensitivität von 43%, die Methode von Roche lediglich 32%. Betrachtet man die Tumorstadien getrennt voneinander, zeigt sich ein deutlicher Anstieg des Anteils der richtig positiven Ergebnisse mit zunehmendem Tumorstadium. Bei Patienten im Stadium IV erreicht der ELISA von DiaSorin eine Sensitivität von 68%, Roche 48% bzw. Dako 54%.

Bei Betrachtung der Spezifität ergibt sich ein umgekehrtes Bild. Mit dem Verfahren von DiaSorin zeigt sich mit 82% der geringste Anteil richtig negativer Befunde bei Patienten in Remission. Das Verfahren von Dako erreicht mit 99% die höchste Spezifität.

Um den Nutzen der Testverfahren in der klinischen Praxis zu bewerten, erfolgt die Berechnung von Vorhersagewerten. Der positive Vorhersagewert gibt an mit welcher Wahrscheinlichkeit ein positives Testergebnis mit einer nachweisbaren Metastasierung

einhergeht. Bei DiaSorin zeigt sich in 38% aller Fälle eine Metastasierung bei positivem Befund, bei Dako in 90%, bei Roche in 69%. Im Stadium IV wurde für DiaSorin ein positiver Vorhersagewert von 88% ermittelt, für Roche 94% und Dako 100%.

Die in dieser Arbeit ermittelten Sensitivitäten, insbesondere des ELISA, werden durch die Ergebnisse bisher veröffentlichter Studien bestätigt. Smit et al. (2005) ermittelten mit den 3 verschiedenen Methoden Sensitivitäten (alle Tumorstadien) zwischen 36 - 47%. Im Stadium VI ergab sich ein Anstieg der Sensitivität auf bis zu 77%. Wollina et al (2000) zeigten in ihrer Arbeit, dass in Abhängigkeit vom Cut-off die Sensitivität (Stadium III und IV) zwischen 64,6% und 70,8% schwankt (Cut-off 0,2µg/L bzw. 0,12µg/L). Die Spezifität betrug 97% bzw. 89,9%

Eine Verschiebung der festgelegten Cut-offs, auf eine höhere Konzentration bei dem ELISA oder auf niedrigere Konzentrationen beim EIA oder ECLIA, würde zu einer Annäherung der beobachteten Sensitivitäten führen. Zum Vergleich der Verfahren unabhängig vom jeweiligen Cut-off erfolgt die Darstellung der Sensitivitäten und Spezifitäten für unterschiedliche Cut-offs anhand von ROC-Kurven. Die Güte des Tests wird von der Fläche unter der Kurve repräsentiert. Je größer die Trennschärfe des Tests, d. h. wie gut können mithilfe des Test kranke Personen von gesunden unterschieden werden, desto größer die Fläche. In unserer Studie konnten wir zeigen, dass bei der Messung mit allen drei Methoden ein zusätzlicher Informationsgewinn durch die Bestimmung des S100-Proteins erhalten werden kann. Die Fläche unter der Kurve (AUC), welche den Informationsgewinn widerspiegelt, liegt zwischen 79,3% bei DiaSorin und 72% bei Roche. Die AUC ist für den ELISA am größten, die ermittelten Konfidenzintervalle für alle drei Verfahren überschneiden sich jedoch weitgehend, sodass die Ergebnisse vergleichbar sind. Keines der Verfahren bietet in Bezug auf die diagnostische Wertigkeit des Tests eindeutige Vorteile gegenüber dem jeweils anderen. Dieses Ergebnis stimmt mit den beobachteten Resultaten der Studie von Smit et al. (2005) sehr gut überein. Die berechneten Flächen unter der Kurve betrugen 62,1-72,4% der Gesamtfläche, ebenfalls mit sich überschneidenden Konfidenzintervallen.

Die beobachteten Ergebnisse zeigen, dass die Festlegung eines Cut-offs und die Einteilung in Test-positive und Test-negative Ergebnisse stets kritisch zu betrachten ist. Die Festlegung dieses Grenzwertes sollte von jedem Labor, welches die Analysen durchführt, selbstständig durch Messung von Kontrollgruppen verifiziert werden. Zusätzlich sollten die Erfahrungen, die mit dem jeweiligen Testverfahren in der klinischen Praxis gesammelt werden, in die

Festlegung von Grenzwerten einbezogen werden. Bei Häufung falsch negativer bzw. falsch positiver Ergebnisse muss eine Anpassung des Cut-offs diskutiert werden.

Zusätzlich ist das individuelle Expressionsmuster des S100-Proteins in malignen Melanomen von Bedeutung. Bánfalvi et al. (2003) untersuchten den Zusammenhang zwischen dem immunhistologischen Expressionsmuster des S100-Proteins des Primärtumors bzw. von Lymphknoten-Metastasen und den mittels eines immunoluminometrischen Tests nachgewiesenen S100-Konzentrationen im Serum der Patienten. Dabei wurden 59 Patienten im Stadium I-III nach AJCC 2002 eingeschlossen. Es zeigte sich, dass bei Patienten im Stadium III mit heterogenem oder diffusem Expressionsmuster signifikant höhere S100-Konzentrationen gemessen wurden als bei Patienten mit fokaler S100-Expression. Weiterhin wurde die Intensität der Markierung des S100-Proteins betrachtet. Patienten mit Tumoren mit starker Markierung wiesen dabei signifikant höhere S100-Werte im Serum auf, als Patienten mit niedriger Intensität der Markierung. Die Resultate der Studie deuten daraufhin, dass Patienten mit fokalem Expressionsmuster und/oder niedriger Intensität der Markierung mit der Bestimmung des S100-Proteins im Serum nicht suffizient im Verlauf der Erkrankung überwacht werden können.

Bei der Betrachtung der Sensitivität und Spezifität eines Tests wird außerdem außer Acht gelassen, wie hoch die eigentlich S100-Konzentration vom Cut-off abweicht. Von Schoultz und Mitarbeiter (1996) sowie Bonfrer et al. (1998) konnten zeigen, dass die ermittelte S100 β -Konzentration signifikant mit der Gesamtüberlebenszeit korreliert, wobei höhere S100-Werte mit einer verminderten Überlebenszeit einhergingen.

S100-Werte oberhalb des Cut-offs erlangen insbesondere an Bedeutung bei Patienten, bei welchen bis zu diesem Zeitpunkt bei Nachsorgeuntersuchungen noch keine erhöhten S100-Werte im Serum beobachtet werden konnten. Neben der obligaten klinischen Untersuchung der Haut und Lymphknoten, sollte sich eine intensivere bildgebende Diagnostik zum Ausschluss von Metastasen anschließen. Bei Patienten mit bekannten erhöhten S100-Konzentrationen sind der absolute Wert des Markers und seine Entwicklung im Verlauf ausschlaggebender für die Beurteilung des Krankheitsverlaufes oder einer Therapieeffizienz. Daher ist es notwendig bei allen Melanompatienten möglichst vor Einleitung einer Therapie, eine initiale Tumormarkerbestimmung durchzuführen. Diese kann als Vergleichswert bei der Nachsorge genutzt werden.

Die Tumormarkerkonzentration bzw. die Konzentrationsänderung ist von mehreren Variablen abhängig. Ausschlaggebend ist die Gesamtzahl der Marker-bildenden Zellen, d. h. die Tumormasse. Weiterhin spielt die Synthese- und die Freisetzungsrate des Tumormarkers aus

der Tumorzelle oder von der Zelloberfläche sowie die jeweilige Blutversorgung eine Rolle. Zu beachten ist weiterhin die biologische Halbwertszeit des Analyten. Eine eingeschränkte Nierenfunktion, Cholestase oder Leberinsuffizienz resultiert in einem verminderten Abbau bzw. verminderter Ausscheidung.

Bei der Interpretation der S100-Konzentrationen sollte außerdem kritisch betrachtet werden, dass andere Krebserkrankungen (Astrozytome, Schwannome, Glioblastome, Ependymome (van Eldik et al. 1986), Chondrosarkome, Chondroblastome (Soder et al. 2006)), renale Insuffizienz, Lebererkrankungen, chronisch entzündliche Darmerkrankungen, kardiovaskuläre Eingriffe, aber vor allem zerebrale Erkrankungen (z. B. Schädelhirntrauma) und Polyneuropathie die Aussagekraft der gemessenen S100-Werte beeinträchtigen (Hein et al. 2006). Außerdem zeigten sich erhöhte Werte bei Trauma-Patienten (Anderson et al. 2001), unabhängig von einer ZNS-Beteiligung.

Weiterhin wurde beobachtet, dass die ermittelten Konzentrationen mit den einzelnen Verfahren nicht direkt vergleichbar sind. Dies zeigt sich eindrücklich in den unterschiedlichen Referenzbereichen. Daher sollte die Bestimmung des S100-Proteins in der Nachsorge von Tumorpatienten stets mit derselben Methode erfolgen. Bei notwendigem Wechsel des Verfahrens sollten vor Umstellung zuerst Parallelmessungen durchgeführt werden.

Als ein wichtiger Kritikpunkt dieser Studie ist bereits im Vorfeld die Festlegung des Cut-offs diskutiert worden. Aufgrund der geringeren Anzahl untersuchter Patienten bei der Bestimmung des S100-Proteins mit dem EIA von Dako, können Verfälschungen bei der statistischen Auswertung der vorhandenen Daten aufgetreten sein. Insbesondere der Anteil von Patienten mit aktuell nachweisbarer Metastasierung war mit insgesamt 22 Patienten sehr gering und damit anfällig für Verzerrungen der Ergebnisse.

Aussagen über die prognostische Relevanz der ermittelten S100-Konzentrationen sowie der Korrelation des Verlaufs des Markers mit dem Verlauf der Erkrankung sind aufgrund des kurzen Beobachtungszeitraums nicht möglich.

7. Schlussfolgerung

In der vorliegenden Arbeit wurden drei verschiedene Methoden zur Bestimmung des S100-Proteins in der klinischen Anwendung bei der Nachsorge von Melanom-Patienten evaluiert. Dabei wurde zum einen untersucht, ob die ermittelten S100-Konzentrationen der einzelnen Verfahren miteinander korrelierbar sind. Weiterhin ist der Zusammenhang zwischen Tumorstadium bzw. aktuell nachweisbarer Metastasierung und der Tumormarkerkonzentration analysiert worden. Außerdem erfolgte die Untersuchung der in Abhängigkeit vom Cut-off ermittelten Testergebnisse auf signifikante Unterschiede. Ziel ist es, das Verfahren zu ermitteln, welches für die Patienten die beste diagnostische Aussagekraft besitzt.

Insgesamt zeigte sich eine gute Korrelation der mit den drei Methoden ermittelten S100-Konzentrationen. Erhöhte Werte des einen Verfahrens gingen mit erhöhten Werten des jeweils anderen Verfahrens einher. Für alle drei Verfahren ließ sich darüber hinaus eine eindeutige Korrelation zwischen erhöhten S100-Konzentrationen im Serum und einer aktuell vorhandenen Metastasierung nachweisen. Patienten im Stadium IV mit systemischer Ausbreitung des Tumors zeigten signifikant höhere Werte als Patienten mit lokalisierten Tumoren bzw. Patienten in Remission.

Unter Berücksichtigung der vom Hersteller festgelegten Cut-offs erfolgte die Einteilung der S100-Konzentrationen in erhöhte Werte und Werte im Referenzbereich. Grundsätzlich sollte die Bestimmung des Cut-offs durch Messungen von Kontrollproben im eigenen Labor und unter Berücksichtigung der klinischen Befunde bestimmt werden. In der vorliegenden Studie wurde eine deutlich höhere Sensitivität für den Sangtec®100 ELISA von DiaSorin (52%) als für den CanAg S100 EIA von DakoCytomation (43%) oder den Elecsys®1010 ECLIA von Roche (32%) beobachtet. Die insgesamt niedrigen Sensitivitäten bestätigen, dass die Bestimmung des S100-Proteins zum Screening eines asymptomatischen Patientenkollektives nicht geeignet ist. Betrachtet man isoliert Patienten im Stadium IV wurde mit dem ELISA eine Sensitivität von 68% erreicht. Die ermittelten Spezifitäten verhielten sich genau entgegengesetzt mit dem niedrigsten Wert für den ELISA von DiaSorin. Der ELISA wies signifikant häufiger falsch positive Werte auf im Gegensatz zu den anderen beiden Verfahren. Durch Anpassung der Cut-offs könnten diese Unterschiede reduziert werden. Betrachtet man die klinische Wertigkeit der Testverfahren unabhängig vom Cut-off mithilfe der Ermittlung von ROC-Kurven, so zeigen die Testverfahren vergleichbare Trennschärfen, d.h. eine vergleichbare Fähigkeit der Tests zwischen Patienten mit und ohne vorhandene Metastasierung unterscheiden zu können. Die absoluten Konzentrationen der einzelnen

Methoden sind jedoch nicht vergleichbar. Daher sollte beim Wechsel von einem auf das andere Verfahren übergangsweise Parallelmessungen vorgenommen werden. Weiterhin wäre die Einführung von Ringversuchen zur Bestimmung des S100-Proteins empfehlenswert. Grundsätzlich ist der individuelle Verlauf des Markers zur Beurteilung des Krankheitsverlaufs am aussagekräftigsten. Werte oberhalb des Cut-offs sind vor allem bedeutsam bei Patienten, die bisher negative S100-Konzentrationen aufwiesen. Eine neu aufgetretene Metastasierung sollte in diesem Fall ausgeschlossen werden.

Bezogen auf die Bestimmung des S100-Proteins bei der Nachsorge der Melanom-Patienten der Klinik für Dermatologie und dermatologische Allergologie der Friedrich-Schiller-Universität in Jena, sind alle drei Verfahren in ihrer Anwendung empfehlenswert. Betrachtet man die Durchführung der Testverfahren, so zeigt das vollautomatische Verfahren von Roche Vorteile aufgrund des geringsten Arbeitsaufwandes und der kürzesten Analysezeit.

8. Literatur- und Quellenverzeichnis

Abbasi NR, Shaw HM, Rigel DS, Friedman RJ, McCarthy WH, Osman I, Kopf AW, Polsky D. 2004. Early diagnosis of cutaneous melanoma: revisiting ABCD criteria. *JAMA*, 292:2771-2776.

Abraha HD, Fuller LC, Du Vivier AWP, Higgins EM, Sherwood RA. 1997. Serum S-100 protein: a potentially useful prognostic marker in cutaneous melanoma. *Br J Dermatol*, 137:381-385.

Alber B, Hein R, Garbe C, Caroli U, Lippa PB. 2005. Multicenter evaluation of the analytical and clinical performance of the Elecsys® S100 immunoassay in patients with malignant melanoma. *Clin Chem Lab Med*, 43: 557-563.

Allore R, O'Hanlon D, Price R, Neilson K, Willard HF, Cox DR, Marks A, Dunn RJ. 1988. Gene encoding the beta subunit of S100 protein is on chromosome 21: Implications for Down syndrome. *Science*, 239:1311-1313.

Altomonte M, Colizzi F, Esposito G, Maio M. 1992. Circulating intercellular adhesion molecule 1 as a marker of disease progression in cutaneous melanoma. *N Engl J Med*, 327:959.

Altomonte M, Gloghini A, Bertela G, Gasparollo A, Carbone A, Ferrone S, Maio M. 1993. Differential expression of cell adhesion molecules CD54/CD11a and CD58/CD2 by human melanoma cells and functional role in their interaction with cytotoxic cells. *Cancer Res*, 53:3343-3348.

Anderson R. 2001. High serum S100B levels for trauma patients without head injuries. *Neurosurgery* 48: 1255-1258.

Atzpodien J, Neuber K, Kamanabrou D, Fluck M, Bröcker EB, Neumann C, Rüniger TM, Schuler G, von den Driesch P, Müller I, Paul E, Patzelt T, Reitz M. 2002. Combination chemotherapy with or without s.c. IL-2 and IFN-alpha: results of a prospectively randomized

trial of the Cooperative Advanced Malignant Melanoma Chemoimmunotherapy Group (ACIMM). *Br J Cancer*, 86:179-184.

Balch CM, Buzaid AC, Soong SJ, Atkins MB, Cascinelli N, Coit DG, Fleming ID, Gershenwald JE, Houghton A Jr, Kirkwood JM, McMasters KM, Mihm MF, Morton DL, Reintgen DS, Ross MI, Sober A, Thompson JA, Thompson JF. 2001. Final version of the American Joint Committee on Cancer staging system for malignant melanoma. *J Clin Oncol*, 19:3635-3648.

Balch CM, Soong SJ, Gershenwald JE, Thompson JF, Reintgen DS, Cascinelli N, Urist M, McMasters KM, Ross MI, Kirkwood JM, Atkins MB, Thompson JA, Coit DG, Byrd D, Desmond R, Zhang Y, Liu PY, Lyman GH, Morabito A. 2001. Prognostic factors analysis of 17,600 melanoma patients: Validation of the American Joint Committee on Cancer melanoma staging system. *J Clin Oncol*, 19:3622-3634.

Bánfalvi T, Boldizsár M, Gergye M, Gilde K, Kremmer T, Ottó S. 2002. Comparison of prognostic significance of serum 5-S-Cysteinyl-dopa, LDH, and S100B protein in Stage III/IV malignant melanoma. *Pathol Oncol Res*, 8:183-187.

Bánfalvi T, Udarhelyi N, Orosz Z, Gergye M, Gilde K, Tímár J. 2003. Heterogenous S-100B protein expression patterns in malignant melanoma and association with serum protein levels. *Oncology*, 64: 374-379.

Battayani Z, Grob JJ, Xerri L, Noe C, Zarour H, Houvaenaghel G, Delpero JR, Birnbaum D, Hassoun J, Bonerandi JJ. 1995. Polymerase chain reaction detection of circulating melanocytes as a prognostic marker in patients with melanoma. *Arch Dermatol*, 131:443-447.

Baudier J, Delphin C, Grunwald D, Khochbin S, Lawrence JJ. 1992. Characterisation of the tumor suppressor protein p53 as a protein kinase C substrate and a S100b-binding protein. *Proc Natl Acad Sci*, 89:11627-11631.

Berk DR, Johnson DL, Uzieblo A, Kiernan M, Swetter SM. 2005. Sentinel lymph node biopsy for cutaneous melanoma: the Stanford experience, 1997-2004. *Arch Dermatol*, 141:1016-1022.

Berking C, Schlüpen EM, Schrader A, Atzpodien J, Volkenandt M. 1999. Tumor markers in peripheral blood of patients with malignant melanoma: Multimarker RT-PCR versus luminoimmunometric assay for S100. *Arch Dermatol Res*, 291:479-484.

Bogdahn U, Apfel R, Hahn M, Gerlach M, Behl C, Hoppe J, Martin R. 1989. Autocrine tumor cell growth-inhibiting activities from human malignant melanoma. *Cancer Res*, 49:5358-5363.

Bonfrer JMG, Korse CM, Nieweg OE, Rankin EM. 1998. The luminescence immunoassay S-100: a sensitive test to measure circulating S-100B: its prognostic value in malignant melanoma. *Br J Cancer*, 77:2210-2214.

Boni R, Burg G, Doguoglu A, Ilg EC, Schafer BW, Muller B, Heizmann CW. 1997. Immunohistochemical localization of the Ca^{2+} binding S100 proteins in normal human skin and melanocytic lesions. *Br J Dermatol*, 137:39-43.

Bosserhoff AK, Hauschild A, Hein R, Schadendorf D, Stockfleth E, Bogenrieder T, Landthaler M, Buettner R, Stolz W. 2000. Elevated MIA serum levels are of relevance for management of metastasized malignant melanomas: results of a German multicenter study. *J Invest Dermatol*, 114:395-396.

Bosserhoff AK, Kaufmann M, Kaluza B, Bartke I, Zirngibl H, Hein R, Stolz W, Buettner R. 1997. Melanoma inhibiting activity, a novel serum marker for progression of malignant melanoma. *Cancer Res*, 57:3149-3153.

Breslow A. 1970. Thickness, cross-sectional areas and depth of invasion in the prognosis of cutaneous melanoma. *Ann Surg*, 172:902-908.

Brossart P, Keilholz U, Willhauck M, Mohler T, Hunstein W. 1993. Hematogenous spread of malignant melanoma cells in different stages of disease. *J Invest Dermatol*, 101:887-889.

Brownbridge GG, Gold J, Edward M, MacKie RM. 2001. Evaluation of the use of tyrosinase-specific reverse transcriptase-coupled-polymerase chain reaction to detect

melanoma cells in peripheral blood samples from 299 patients with malignant melanoma. *Br J Dermatol*, 144:279-287.

Busam KJ, Jungbluth AA. 1999. Melan-A, a new melanocytic differentiation marker. *Adv Anat Pathos*, 6:12-18.

Cascinelli N, Morabito A, Santinami M, MacKie RM, Belli F. 1998. Immediate or delayed dissection of regional nodes in patients with melanoma of the trunk: a randomised trial. WHO Melanoma Programme. *Lancet*, 351:793-796.

Cho KH, Hashimoto K, Taniguchi Y, Pietruk T, Zarbo RJ, An T. 1990. Immunohistochemical study of melanocytic nevus and malignant melanoma with monoclonal antibodies against S-100 subunits. *Cancer*, 66:765-771.

Clark WH Jr, From L, Bernadino EA, Mihm MC. 1969. The histiogenesis and biologic behaviour of primary human malignant melanomas of the skin. *Cancer Res*, 29:705-727.

Clarkson KS, Sturdess IC, Molyneux AJ. 2001. The usefulness of tyrosinase in the immunohistochemical assessment of melanocytic lesions: a comparison of the novel T311 antibody (anti-tyrosinase) with S-100, HMB45 and A103 (anti-melan-A). *J Clin Pathol*, 54:196-200.

Coulie PG, Brichard V, Van Pel A, Wölfel T, Schneider J, Traversari C, Mattei S, De Plaen E, Lurquin C, Szikora JP, Renauld JC, Boon T. 1994. A new gene coding for a differentiation antigen recognized by autologous cytolytic T lymphocytes on HLA-A2 melanomas. *J Exp Med*, 180:35-42.

Curry BJ, Farrelly M, Hersey P. 1999. Evaluation of S-100beta assays for the prediction of recurrence and prognosis in patients with AJCC stage I-III melanoma. *Melanoma Res*, 9:557-567.

Deichmann M, Benner A, Bock M, Jäckel A, Uhl K, Waldmann V, Näher H. 1999. S100-beta, melanoma-inhibiting activity, and lactate dehydrogenase discriminate progressive from nonprogressive American Joint Committee on Cancer Stage IV melanoma. *J Clin Oncol*, 17:1891-1896.

Djukanovic D, Hofmann U, Sucker A, Rittgen W, Schadendorf D. 2000. Comparison of S100 protein and MIA protein as serum marker for malignant melanoma. *Anticancer Res*, 20:2203-2207.

Donato R. 1986. S-100 proteins. *Cell Calcium*, 7:123-145.

Eckert RL, Broome AM, Ruse M, Robinson N, Ryan D, Lee K. 2004. S100 proteins in the epidermis. *J Invest Dermatol*, 123:23-33.

Fagnart OC, Sindic CJ, Laterre C. 1988. Particle counting immunoassay of S100 protein in serum. Possible relevance in tumors and ischemic disorders of the central nervous system. *Clin Chem*, 34:1387-1391.

Fargnoli MC, Argenziano G, Zalaudek I, Peris K. 2006. High and low penetrance cutaneous melanoma susceptibility genes. *Expert Rev Anticancer Ther*, 6:657- 670.

Garbe C. 1995. Risikofaktoren für die Entwicklung maligner Melanome und Identifikation von Risikopersonen im deutschsprachigen Raum. *Hautarzt*, 46:309-314.

Garbe C. 1992. Sonne und malignes Melanom. *Hautarzt* 43:251-257.

Garbe C, Buttner P, Weiss J, Soyer HP, Stocker U, Kruger S, Roser M, Weckbecker J, Panizzon R, Bahmer F. 1994. Associated factors in the prevalence of more than 50 common melanocytic nevi, atypical melanocytic nevi, and actinic lentigines: multicenter case-control study of the Central Malignant Melanoma Registry of the German Dermatological Society. *J Invest Dermatol*, 102:700-705.

Garbe C, Leiter U, Ellwanger U, Blaheta HJ, Meier F, Rassner G, Schitteck B. 2003. Diagnostic value and prognostic significance of protein S-100 β , melanoma-inhibitory activity, and tyrosinase/MART-1 reverse transcription-polymerase chain reaction in the follow-up of high-risk melanoma patients. *Cancer*, 97:1737-1745.

Garbe C, Schadendorf D. 2003. Surveillance and follow-up examinations in cutaneous melanoma. *Onkologie*, 26:241-246.

Garbe C, Hauschild A, Volkenandt M, Schadendorf D, Stolz W, Kortmann RD, Kettelhack C, Frerich B, Keilholz U, Dummer R, Sebastian G, Tilgen W, Schuler G, Mackensen A, Kaufmann R. 2005. Deutsche Leitlinie: Malignes Melanom. In: Garbe C (Hrsg.) Interdisziplinäre Leitlinien zur Diagnostik und Behandlung von Hauttumoren. Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag, 23-55

Gaynor R, Irie R, Morton D, Herschman HR. 1980. S100 protein is present in cultured human malignant melanomas. *Nature*, 286:400-401.

Gershenwald JE, Colome MI, Lee JE, Mansfield PF, Tseng C, Lee JJ, Balch CM, Ross MI. 1998. Patterns of recurrence following a negative sentinel lymph node biopsy in 243 patients with stage I or II melanoma. *J Clin Oncol*, 16:2253-2260.

Glaeser R, Rass K, Seiter S, Hauschild A, Christophers E, Tilgen W. 1997. Detection of circulating melanoma cells by specific amplification of tyrosinase complementary DNA is not a reliable tumor marker in melanoma patients: a clinical two-center study. *J Clin Oncol*, 15:2818-2825.

Guder WG, Nolte J, Hrsg. 2005. Das Laborbuch für Klinik und Praxis. 1. Auflage. München/Jena: Urban & Fischer bei Elsevier, 425-436.

Guo HB, Stoffel-Wagner B, Bierwirth T, Mezger J, Klingmüller D. 1995. Clinical significance of serum S100 in metastatic malignant melanoma. *Eur J Cancer*, 31A:924-928.

Haass N, Smalley KSM, Li L, Herlyn M. 2005. Adhesion, migration and communication in melanocytes and melanoma. *Pigment Cell Res*, 18:150-159.

Haimoto H, Hosada S, Kato K. 1987. Differential distribution of immunoreactive S100-alpha and S100-beta proteins in normal nonnervous human tissues. *Lab Invest*, 57:489-98.

Harning R, Mainolfi E, Bystryn JC, Henn M, Merluzzi VJ, Rothlein R. 1991. Serum levels of circulating intercellular adhesion molecule 1 in human malignant melanoma. *Cancer Res*, 51:5003-5005.

Hauschild A, Engel G, Brenner W, Gläser R, Mönig H, Henze H, Christophers E. 1999a. S100B protein detection in serum is a significant prognostic factor in metastatic melanoma. *Oncology*, 56: 338-344.

Hauschild A, Engel G, Brenner W, Gläser R, Mönig H, Henze H, Christophers E. 1999b. Predictive value of serum S100B for monitoring patients with metastatic melanoma during chemotherapy and/or immunotherapy. *Br J Dermatol*, 140:1056-1071.

Hein R, Bosserhoff A, Ring J. 2006. Tumormarker beim malignen Melanom. *Dtsch Arztebl*, 103:A943-948.

Henze G, Dummer R, Joller-Jemelka HI, Boeni R, Burg G. 1997. Serum S100 -- a marker for disease monitoring in metastatic melanoma. *Dermatology*, 194:208-212.

Holly EA, Kelly IW, Shpall SN, Chin SH. 1987. Number of melanocytic nevi as a major risk factor for malignant melanoma. *J Am Acad Dermatol*, 17:459-468.

Isobe T, Okuyama T. 1978. The amino-acid sequence of S-100 protein (PAP 1-b) and its relation to the calcium-binding proteins. *Eur J Biochem*, 89:379-88.

Isobe T, Okuyama T. 1981. The amino-acid sequence of the alpha subunit in bovine brain S-100a protein. *Eur J Biochem*, 116:79-86.

Juergensen A, Holzapfel U, Hein R, Stolz W, Buettner R, Bosserhoff A. 2001. Comparison of two prognostic markers for malignant melanoma: MIA and S100 beta. *Tumor Biol*, 22:54-58.

Kaskel P, Berking C, Sander S, Volkenandt M, Peter RU, Krähn G. 1999. S-100 protein in peripheral blood: a marker for melanoma metastases. *J Am Acad Dermatol*, 41: 962-969.

Kawakami Y, Eliyahu S, Delgado CH, Robbins PF, Rivoltini L, Topalian SL, Miki T, Rosenberg SA. 1994. Cloning of the gene coding for a shared human melanoma antigen recognized by autologous T cells infiltrating into tumor. *Proc Natl Acad Sci USA*, 91:3515-3519.

Kennedy C, Bajdik CD, Willemze R, De Gruijl FR, Bouwes Bavinck JN. 2003. Leiden Skin Cancer Study, The influence of painful sunburns and lifetime sun exposure on the risk of actinic keratoses, seborrheic warts, melanocytic nevi, atypical nevi and skin cancer. *J Invest Dermatol*, 120:1087-1093.

Kindblom LG, Lodding P, Rosengren L, Baudier J, Haglid K. 1984. S-100 protein in melanocytic tumors. An immunohistochemical investigation of benign and malignant melanocytic tumors and metastases of malignant melanoma and a characterization of the antigen in comparison to human brain. *Acta Pathol Microbiol Immunol Scand [A]*, 92:219-230.

Krähn G, Kaskel P, Rust A, Peter RU. 1998. Serum-S100 bei metastasierendem Melanom. *MMW*, 140: 326-327.

Kretsinger RH, Nockolds CE. 1973. Carp muscle calcium-binding protein, II. Structure determination and general description. *J Biol Chem*, 248:3313-3326.

Lasithiotakis KG, Leiter U, Eigentler T, Breuninger H, Metzler G, Meier F, Garbe C. 2007. Improvement of overall survival of patients with cutaneous melanoma in Germany, 1976-2001, Which factors contributed? *Cancer*, 109:1174-1182.

Lasithiotakis KG, Leiter U, Gorkiewicz R, Eigentler T, Breuninger H, Metzler G, Strobel W, Garbe C. 2006. The incidence and mortality of cutaneous melanoma in southern Germany, Trends by anatomic site and pathologic characteristics, 1976 to 2003. *Cancer*, 107:1331-1339.

Loppin M, Quillien V, Adamski H, Ollivier I, Garlantézec R, Chevrant-Breton J. 2007. Protéine S100 Béta et Melanoma Inhibitory Activity (MIA) sériques : étude prospective de leur valeur pour la détection précoce de métastases dans le mélanome. *Ann Dermatol Venereol*, 134:535-540.

Meier F, Will S, Ellwanger U, Schlagenhauß B, Schitteck B, Rassner G, Garbe C. 2002. Metastatic pathways and time courses in the orderly progression of cutaneous melanoma. *Br J Dermatol*; 147:62-70.

Moore B. 1965. A soluble protein characteristic of the nervous system. *Biochem Biophys Res Commun*, 19:739-744.

Morton DL, Thompson JF, Cochran AJ, Mozzillo N, Elashoff R, Essner R, Nieweg OE, Roses DF, Hoekstra HJ, Karakousis CP, Reintgen DS, Coventry BJ, Glass EC, Wang HJ, MSLT Group. 2006. Sentinel- node biopsy or nodal observation in melanoma. *N Engl J Med*, 355:1307-1317.

Nakajima T, Watanabe S, Sato Y, Shimasoto Y, Ishihara K. 1982. Immunohistochemical demonstration of S100 protein in malignant melanoma and pigmented nevus, and its diagnostic application. *Cancer*, 50:912-918.

Orlow SJ, Silvers WK, Zhou BK, Mintz B. 1998. Comparative decreases in Tyrosinase, TRP-1, TRP-2 and Pmel 17/silver antigenic proteins from melanotic to amelanotic stages of syngenic mouse cutaneous melanomas and metastases. *Cancer Res*, 58:1521-1523.

Palmieri G, Ascierto PA, Perrone F, Satriano SF, Ottaiano A, Daponte A, Napolitano M, Caracò C, Mozzillo N, Melucci MT, Cossu A, Tanda F, Gallo C, Satriano RA, Castello G. 2003. Prognostic value of circulating melanoma cells detected by reverse transcriptase polymerase chain reaction. *J Clin Oncol*, 21:767-773.

Pittman K, Burchill S, Smith B, Southgate J, Joffe J, Gore M, Selby P. 1996. Reverse transcriptase-polymerase chain reaction for expression of tyrosinase to identify malignant melanoma cells in peripheral blood. *Ann Oncol*, 7:297-301.

Povey JE, Darakhshan F, Robertson K, Bisset Y, Mekky M, Rees J, Doherty V, Kavanagh G, Anderson N, Campbell H, MacKie RM, Melton DW. 2007. DNA repair gene polymorphism and genetic predisposition to cutaneous melanoma. *Carcinogenesis*, 28:1087-1093

Reinhold U, Berkin C, Bosserhoff AK, Deutschmann A, Garbe C, Gläser R, Hein R, Krähn G, Peter RU, Rappl G, Schitteck B, Seiter S, Ugurel S, Volkenandt M, Tilgen W. 2001. Interlaboratory evaluation of a new reverse transcriptase polymerase chain reaction-based enzyme linked immunosorbent assay for the detection of circulating melanoma cells: A

multicenter study of the Dermatologic Cooperative Oncology Group. *J Clin Oncol*, 19:1723-1727.

Santamaria-Kisiel L, Rintala-Dempsey AC, Shaw GS. 2006. Review article: Calcium-dependent and -independent interactions of the S100 protein family. *Biochem J*, 396:201-214.

Sarantou T, Chi DD, Garrison DA, Conrad AJ, Schmid P, Morton DL, Hoon DS. 1997. Melanoma-associated antigens as messenger RNA detection markers for melanoma. *Cancer Res*, 57:1371-1376.

Schadendorf D, Diehl S, Zuberbier T, Schadendorf C, Henz BM. 1996. Quantitative detection of soluble adhesion molecules in sera of melanoma patients correlates with clinical stage. *Dermatology*, 192:89-93.

Schittek B, Bodingbauer Y, Ellwanger U, Blaheta HJ, Garbe C. 1999. Amplification of MelanA messenger RNA in addition to tyrosinase increases sensitivity of melanoma cell detection in peripheral blood and is associated with the clinical stage and prognosis of malignant melanoma. *Br J Dermatol*, 141:30-36.

Schmitz C, Brenner W, Henze E, Christophers E, Hauschild A. 2000. Comparative study on the clinical use of protein S-100B and MIA (melanoma inhibitory activity) in melanoma patients. *Anticancer Res*, 20:5059-5063.

Schultz ES, Diepgen TL, von den Driesch P. 1998. Clinical and prognostic relevance of serum S-100 β protein in malignant melanoma. *Br J Dermatol*, 138:426-430.

Semple JL, Gupta AK, From L, Harasiewicz KA, Saunder DN, Foster FS, Turnbull DH. 1995. Does high-frequency (40-60MHz) ultrasound imaging play a role in the clinical management of cutaneous melanoma? *Ann Plast Surg*, 34:599-605.

Smit LHM, Korse CM, Bonfrer JMG. 2005. Comparison of four different assays for determination of serum S-100B. *Int J Biol Markers*, 20: 34-42.

Smith B, Selby P, Southgate J, Pittman K, Bradley C, Blair G. 1991. Detection of melanoma cells in peripheral blood by means of reverse transcriptase and polymerase chain reaction. *Lancet*, 338:1227-1229.

Soder S, Oliveira AM, Inwards CY, Muller S, Aigner T. 2006. Type II collagen, but not aggrecan expression, distinguishes clear cell chondrosarcoma and chondroblastoma. *Pathology*, 38:35-38.

Soto JL, Cabrera CM, Serrano S, Lopez-Nevot MA. 2005. Mutation analysis of genes that control the G1/S cell cycle in melanoma: TP 53, CDKN 1A, CDKN 2A and CDKN 2B. *BMC Cancer*, 5:36.

Stahlecker J, Gauger A, Bosserhoff A, Buettner R, Ring J, Hein R. 2000. MIA as a reliable tumor marker in the serum of patients with malignant melanoma. *Anticancer Res*, 20:541-544.

Stigbrand T, Nyberg L, Ullén A, Haglid K, Sandström E, Brundell J. 2000. A new specific method for measuring S-100B in serum. *Int J Biol Markers*, 15:33-40.

Tas F, Yasasever V, Duranyildiz D, Camlica H, Ustuner Z, Aydiner A, Topuz E. 2004. Clinical value of protein S100 and melanoma-inhibitory activity (MIA) in malignant melanoma. *Am J Clin Oncol*, 27:225-228.

Tomescu D, Kavanagh G, Ha T, Campell H, Melton DW. 2001. Nucleotide excision repair gene XPD polymorphisms and genetic predisposition to melanoma. *Carcinogenesis*, 22:403-408.

Van Eldik RJ, Jensen RA, Ehrenfried BA, Whetsell WO Jr. 1986. Immunohistochemical localisation of S100 beta in human nervous system tumors by using monoclonal antibodies with specificity for the S100 beta polypeptide. *J Histochem Cytochem*, 34:977-982.

Viac J, Gueniche A, Faure M, Claudy A. 1993. Soluble intercellular adhesion molecule 1 (sICAM-1) and malignant melanoma. *Cancer Lett*, 72:191-194.

Von Schoultz E, Hansson LO, Djureen E, Hansson J, Kärnell R, Nilsson B, Stigbrand T, Ringborg U. 1996. Prognostic value of serum analyses of S-100 β protein in malignant melanoma. *Melanoma Res*, 6:133-137.

Waldmann V, Deichmann M, Jäckel A. 2001. Disseminierte Melanomzellen in Blut und Knochenmark: Bedeutung und Nachweis durch potentielle Tumormarker. *Hautarzt*, 51:298-303.

Wollina U, Karte K, Olbertz K, Hipler UC. 1998. Simultaneous measurement of circulating intercellular adhesion molecule-1 and serum copper zinc superoxide dismutase activity in patients with malignant melanoma. *Oncol Rep*, 5:473-476.

Zimmer DB, Wright SP, Weber DJ. 2003. Molecular mechanisms of S100-target protein interactions. *Microsc Res Tech*, 60:552-559.

Internet-Quellen:

Deutsche Krebshilfe Hrsg. 2008. Malignes Melanom im Frühstadium heilbar, Früherkennung als Chance im Kampf gegen Hautkrebs.

[http://www.krebshilfe.de/aktuelle-themen.html?&tx_ttnews\[tt_news\]=2604&tx_ttnews\[backPid\]=158&cHash=3a0a0f3ac8](http://www.krebshilfe.de/aktuelle-themen.html?&tx_ttnews[tt_news]=2604&tx_ttnews[backPid]=158&cHash=3a0a0f3ac8)

Garbe C, Hauschild A, Volkenandt M, Schadendorf D, Stolz W, Reinhold U, Kotmann RD, Kettelhack C, Frerich B, Keilholz U, Dummer R, Sebastian G, Tilgen W, Schuler G, Mackensen A, Kaufmann R. 2005. Deutsche Leitlinie: Malignes Melanom. Vers. 15.

<http://www.ado-homepage.de/index.php?ID=71>

9. Anhang

9.1. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen Personen danken, die die Erstellung dieser Dissertation möglich gemacht haben.

Ich bedanke mich bei Herrn Prof. Norgauer für die Bereitstellung der Doktorarbeit, welche mir einen Einblick in die komplexe Betreuung von Patienten mit malignem Melanom ermöglichte.

Großer Dank gilt Oberarzt Dr. Kaatz für die gute Betreuung während der Erstellung der Arbeit, für die wichtigen Hilfestellungen und Anregungen bei der Erarbeitung des Manuskripts sowie der unermüdlichen Motivation und des Engagements für diese Arbeit.

Weiterhin gilt mein Dank den Mitarbeiter/innen des Forschungslabors der Klinik für Dermatologie und dermatologische Allergologie für die Analyse der Patientenserien und Bereitstellung der Daten, sowie für die Einführung in die verschiedenen Untersuchungsmethoden. Besonderer Dank gilt Frau Dr. Hipler für die stets freundliche und ermutigende Unterstützung.

Ich bedanke mich bei Herrn Prof. Vollandt für die Beratung bei der statistischen Auswertung der Daten.

Außerdem gilt mein Dank meiner Familie für die unermüdliche Unterstützung und Motivation diese Arbeit zu beenden. Besonderer Dank gilt Christian Voigtländer, der immer ein offenes, verständnisvolles Ohr für mich hatte und mich auch bei der Erstellung der Diagramme beraten und unterstützt hat.

Vielen Dank.

9.2. Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben:

Oberarzt Dr. med. Martin Kaatz

Dr. rer. nat. Uta-Christina Hipler

Mitarbeiter des Forschungslabors der Klinik für Dermatologie
und dermatologische Allergologie in Jena

Karsten Kirsch

Dr. rer. nat. Rüdiger Vollandt

Christian Voigtländer,

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Jena, den 28. 10. 2008

Unterschrift des Verfassers

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Ziermann
Vorname: Anika
Geburtstag: 22.03.1983
Geburtsort: Rudolstadt
Eltern: Horst Ziermann, Dipl.- Ing. für Maschinenbau
Ellen Ziermann, Dipl.- Ing. für Holzverarbeitungstechnik
Geschwister: Janine Ziermann, Dipl. Biologin
Marian Ziermann, Einzelhandelskaufmann
Familienstand: ledig

Schul Ausbildung

09/89 - 07/93 Staatliche Grundschule F.-Fröbel-Str. 72 Rudolstadt
09/93 - 06/01 Friedrich-Fröbel-Gymnasium Bad Blankenburg

Studium

10/01 – 12/07 Studium der Humanmedizin an der Friedrich-Schiller-Universität Jena

Studentische Praktika

Praktisches Jahr: Universitätsklinikum der FSU Jena
08/06 - 12/06 Klinik für Innere Medizin II,
• Abteilung für Infektiologie und Geriatrie
12/06 - 03/07 Klinik für Anästhesiologie und Intensivmedizin
03/07 - 07/07 Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Gefäßchirurgie

Studentische Nebentätigkeiten

- | | |
|---------------|--|
| 08/02 - 12/02 | Max-Planck-Institut für Chemische Ökologie, Jena <ul style="list-style-type: none"> • Isolation von RNA |
| 02/04 - 03/04 | Institut für Biochemie des Universitätsklinikums Jena <ul style="list-style-type: none"> • Betreuung des Biochemie Praktikums für Humanmediziner |
| 04/05 – 12/06 | Klinik für Dermatologie und dermatologische Allergologie, FSU Jena <ul style="list-style-type: none"> • Aufarbeitung und Eingabe von Patientendaten in das Tumorregister für maligne Melanome |

Wissenschaftlicher Werdegang

- | | |
|----------------------------------|--|
| 12/04 -
voraussichtlich 11/08 | Klinikum für Dermatologie und Allergologie der FSU Jena
Betreuer: Prof. Dr. J. Norgauer, OA Dr. M. Kaatz

Thema: Vergleich von drei verschiedenen Methoden zur Bestimmung des S100-Proteins im Serum von Patienten mit malignem Melanom |
|----------------------------------|--|

Beruflicher Werdegang

- | | |
|------------|--|
| Seit 02/08 | Assistenzärztin für Innere Medizin Abteilung Hämatologie/Onkologie
Klinik für Innere Medizin II der Friedrich-Schiller-Universität Jena |
|------------|--|

.....

Unterschrift